

## Alternativas del establecimiento *in vitro* en la micropropagación de la Guana

Pablo Peña González\*, Edgar Acosta Acosta, Lydia Galindo Menéndez, Juan C. Bango Folgoso.

\*Autor por correspondencia.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario de Las Tunas. Ave. Carlos J. Finlay s/n. Las Tunas. Cuba.  
e-mail: pablop70@ult.edu.cu

### RESUMEN

Una alternativa que debe ser explotada en especies forestales, para lograr grandes volúmenes de plantas y establecer plantaciones mejoradas es el empleo de métodos biotecnológicos. La Guana (*Hildegardia cubensis* Urb.) es una especie amenazada. En Las Tunas son contados los árboles silvestres de esta especie. La tala para aprovechar sus fibras y la existencia de ganado libre en las zonas boscosas contribuyen a una reducción cada vez mayor de sus poblaciones. Por este motivo se han buscado alternativas de producción de esta especie en forma masiva. Para el estudio se utilizó una planta que reunía los requisitos establecidos como planta donadora, de ella se tomaron las semillas y esquejes de donde se extrajeron ápices y segmentos nodales, con el propósito de definir algunas alternativas del establecimiento *in vitro*. Se realizaron dos experimentos: el establecimiento de ápices y segmentos nodales unido a diferentes métodos de desinfección del explante y el establecimiento a partir de semillas germinadas *in vitro*. Se comprobó que al utilizar ápices tratados con NaOCl se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la contaminación microbiana y la formación de brotes en los explantes. A partir de semillas germinadas *in vitro* se obtuvieron los mejores resultados al utilizar HgCl<sub>2</sub> al 0.25 %.

Palabras clave: desinfección, forestal, propagación *in vitro*

### ABSTRACT

Alternative of the *in vitro* establishment in the micropropagation of the Guana. An alternative that should be exploited in forest species, to achieve high volumes of plants and to establish improved plantations, is the employment of biotechnical methods. Guana (*Hildegardia cubensis* Urb.) is a threatened species. In Las Tunas are few the wild trees of this species. The pruning for to take advantage of their fibers and the existence of free livestock in the forestry areas contribute to a reduction every time bigger than their populations. For this reason it has looked for alternatives of propagation of this species in massive form. For the present study a plant was used that gathered the established requirements as donor plant, the seeds were tooked and cutting of where apexes were extracted and nodal segments, with the purpose of defining some alternatives of the one *in vitro* establishment. Two experiments were carried out: the establishment of apexes and nodal segments together to different methods of disinfection of the explant and the establishment starting from seeds germinated *in vitro*. It was proven that to the one to use apexes treated with NaOCl the best results was obtained as for the microbial contamination and the formation of buds in the explants. Starting from seeds germinated *in vitro* the best results were obtained when using HgCl<sub>2</sub> to 0.25%.

Key words: disinfection, forest, *in vitro* propagation

La Guana es una especie forestal categorizada como en peligro de extinción, endémica de la zona oriental. Desde tiempos remotos la corteza interior se utiliza para amarrar los tercios de tabaco así como para la confección de obras artesanales.

Se han logrado varios protocolos de micropropagación que parten de segmentos nodales de plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro* (Carrizosa y Serrano, 1997; Maruyama e Ishii, 1997; Valverde *et al.*, 1998 y Nápoles *et al.*, 2001). También se han realizado trabajos en árboles en peligro de extinción como la micropropagación de *Hildegardia populnifolia* (Anuradha y Pullaiah, 1999) y en *Diospyros crassinervis* (Morales *et al.*, 1998).

Sin embargo, la propagación y el mejoramiento genético de árboles por sistemas biotecnológicos tiene

como principal limitante la dificultad del manejo *in vitro* del material vegetal adulto. Esto se debe a las complicaciones que se derivan de las características inherentes a los árboles y/o órgano donador del explante, las cuales incluyen la capacidad de respuesta morfogénica asociada con aspectos fisiológicos y fitosanitarios.

Teniendo en cuenta que la Guana es una especie en peligro de extinción y que no existen referencias acerca de su micropropagación, se realizó este trabajo con el objetivo de determinar alternativas en el establecimiento *in vitro*.

Para el estudio se utilizó como planta madre o donadora un ejemplar ubicado en el municipio de Las Tunas que reunía los requisitos establecidos. De esta planta se tomaron las semillas y esquejes de donde se extrajeron ápices y segmentos nodales.

El primer experimento consistió en el establecimiento de ápices y segmentos nodales, unido a diferentes métodos de desinfección del explante, estudiando los siguientes tratamientos:

1. Apice con NaOCl (1 %)
2. Apice con NaOCl (3 %)
3. Apice con HgCl<sub>2</sub> (0.1 %)
4. Apice con HgCl<sub>2</sub> (0.2 %)
5. Segmentos nodales con NaOCl (1 %)
6. Segmentos nodales con NaOCl (3 %)
7. Segmentos nodales con HgCl<sub>2</sub> (0.1 %)
8. Segmentos nodales con HgCl<sub>2</sub> (0.2 %)

Se utilizaron tres explantes por frasco con 25 ml de medio de cultivo y ocho frascos por tratamientos. Al cabo de tres semanas se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de explantes contaminados (%), porcentaje de explantes con brotes (%) y porcentaje de mortalidad (%).

El segundo experimento consistió en el establecimiento de semillas germinadas *in vitro*. Las semillas se pusieron a germinar en tubos de ensayos de 15 X 2.5 cm, que contenía 10 ml de medio de cultivo. Para el establecimiento de los explantes se empleó el medio de cultivo basal compuesto por las sales, vitaminas y sacarosa de Murashige y Skoog (1962). Se mantuvieron seis semanas en una cámara de luz solar a 27± 2 °C de temperatura.

Se estudiaron tres tratamientos donde se evaluó el efecto de la desinfección durante 10 minutos: 0.15, 0.20, y 0.25 % de HgCl<sub>2</sub>. Se evaluó al cabo de las seis semanas las siguientes variables: porcentaje de germinación (%), porcentaje de contaminación por bacterias (%), porcentaje de contaminación por hongos (%) y porcentaje de supervivencia (%).

Se utilizó un diseño completamente al azar para el procesamiento estadístico y como prueba de comparación de medias la de Duncan, al 5 % de significación (Lerch, 1977).

En el establecimiento *in vitro* a partir de ápices y segmentos nodales y teniendo en cuenta las variables estudiadas se obtuvo que en el porcentaje de contaminación microbiana hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 1).

Se comprobó que al utilizar ápices tratados con NaOCl al 1 y 3 % respectivamente se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la contaminación (55 y 30 %) y la formación de brotes en los explantes (35 y 25 %), aunque tuvieron elevados porcentajes de mortalidad.

Similares resultados refirieron Sierra *et al.* (2001) en la desinfección de yemas apicales en *Philodendron xanadu*, pero con la diferencia de la utilización de Ca(OCl)<sub>2</sub> en vez de NaOCl.

Tabla1. Comportamiento de diferentes tipos de explantes y desinfectantes en el establecimiento *in vitro* de la Guana.

Tratamientos	Porcentaje de explantes contaminados	Porcentaje de explantes con brotes	Porcentaje de mortalidad
1. Apice con NaOCl (1 %)	55 c	35 a	10 c
2. Apice con NaOCl (3 %)	30 d	25 abc	50 a
3. Apice con HgCl <sub>2</sub> (0.1 %)	95 a	5 d	0 d
4. Apice con HgCl <sub>2</sub> (0.2 %)	75 b	25 abc	0 d
5. Segmentos nodales con NaOCl (1 %)	100 a	0 d	0 d
6. Segmentos nodales con NaOCl (3 %)	100 a	0 d	0 d
7. Segmentos nodales con HgCl <sub>2</sub> (0.1%)	60 c	5 bd	35 b
8. Segmentos nodales con HgCl <sub>2</sub> (0.2 %)	60 c	10 a	30 b
CV (%)	0.67	3.84	0.77
ESx	0.0101*	0.0653*	0.0132*

Letras desiguales en una misma columna difieren entre si para p<0.05. Según la prueba de rangos múltiples de Dunca.

En el establecimiento a partir de semillas germinadas *in vitro* y según las variables estudiadas, se apreció en cuanto al porcentaje de contaminación por bacterias hubo diferencias significativas entre los tratamientos, encontrando los mejores resultados en el tratamiento tres que difirió significativamente de los demás. (Figura 1).

En cuanto a los porcentajes de la contaminación por hongos, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, pero en el tratamiento tres fue donde hubo menos porcentaje de contaminación.

En el caso de la supervivencia tampoco existieron diferencias significativas entre los tratamientos,

aunque en el tratamiento tres fue mayor el porcentaje, demostrando que esta fase de la micropropagación no está limitada solamente al aspecto sanitario de los explantes sino también a la supervivencia (Jiménez, 1998).

Se han publicado trabajos donde se parte de semillas de frutas de árboles seleccionados usando desinfecciones similares a las utilizadas en este trabajo,

aunque con un mayor tiempo de exposición de los explantes (Agramonte *et al.*, 2001).

Se obtuvieron los mejores resultados al utilizar  $\text{HgCl}_2$  al 0.25 % durante 10 minutos (Figura 2), lográndose un 46.66 % de contaminación por hongos y un 53.33 % de supervivencia, sin la presencia de contaminación por bacterias.

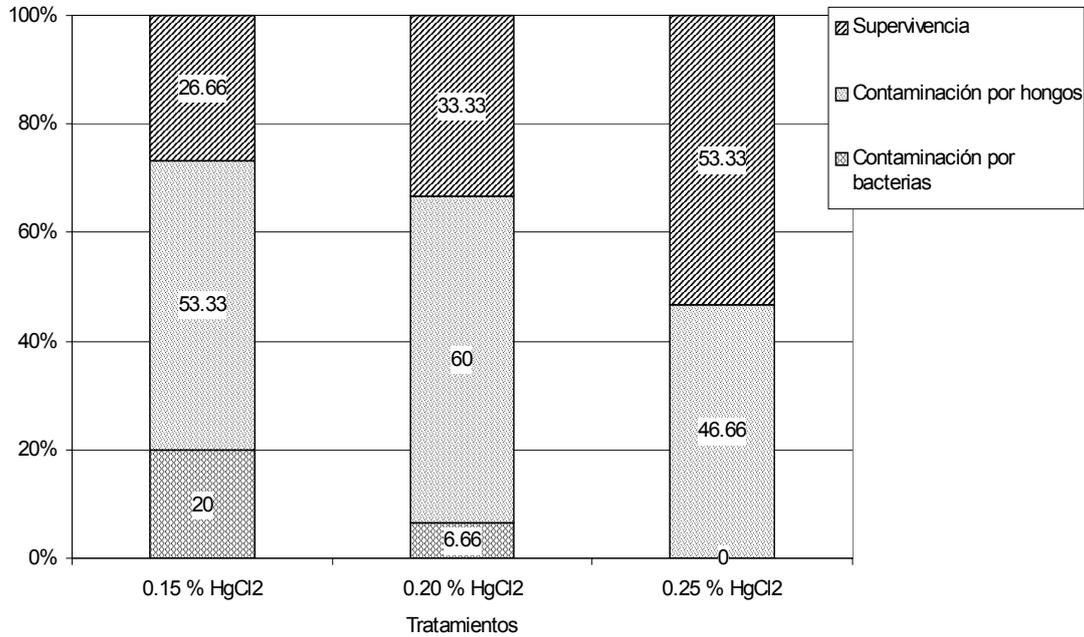


Figura 1. Efecto de la concentración de  $\text{HgCl}_2$  sobre las semillas germinadas *in vitro* de Guana en la fase de establecimiento.



Figura 2. Planta *in vitro* de Guana en fase de establecimiento a partir de semillas germinadas *in vitro*.

## REFERENCIAS

Agramonte, D, Pérez J, Pérez M y Gutiérrez O (2001). Micropropagación de la *Psidium guajaba* var. Enana Roja. BioVeg 2001. Libro de reportes cortos. Ciego de Avila. Cuba

Anuradha, T y Pullajah, T (1999). Micropropagation of an endangered tree species (*Hildegardia populnifolia*). Roxb. Schott & Endl. En: XIV International Botanical Congress. Anantapur. India

Carrizosa, MS y Serrano, C (1997). Propagación de (*Cedrela montana*) por cultivo *in vitro*. Memorias del IV

congreso de la Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. Tomo II: 255-260

Jiménez, E (1998). Cultivo de ápices y meristemo. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, pp. 45-56. IBP, Santa Clara

Lerch, G (1977). La Experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Edición Científico Técnica. La Habana

Maruyama, E y Ishii, K (1997). Tissue culture studies on Bio-Leaf Mahogany *Swietenia macrophylla*, Proc. Int. Workshop BIO-REFOR, pp. 116-117 Australia

- Morales, L, Sotolongo, R, Alvarez, M y Ferro, N (1998). Establecimiento *in vitro* de explantes de *Diospyros crassinervis* (KRUG y URB) standl. Libro Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO'98. p. 62. La Habana
- Murashige, T y Skoog, F (1962). A revised medium for rapid growth and biossays, with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15:473-497
- Nápoles, L, Trujillo, R, Concepción, O y Aurora, P (2001). Establecimiento *In vitro* de plantas elites de Guayaba Enana (*Psidium Guajava L.*). BioVeg 2001. Libro de reportes cortos. Ciego de Avila. Cuba
- Sierra, AP, Concepción, O, Trujillo, R y Daquinta, M (2001). Optimización de la metodología de desinfección de yemas apicales de *Philodendron xanadu*. BioVeg 2001. Libro de reportes cortos. Ciego de Avila. Cuba
- Valverde, L., Dufour M y Villalobos V (1998). *In vitro* organogenesis in (*Albizia guachapele*), (*Cedrella odorata*) and (*Swietenia macrophylla*) (Fabaceae, Meliaceae). *Rev Trop.* 46(2): 225-228