

Influencia del 6-BAP, el período y el número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de *Ruta graveolens*

Karen Alvarado Ruffo*¹, Marcos Daquinta Gradaille², Albaro Blanco Imbert¹, Loexis Rodríguez Montoya¹, Enidia Téllez Fuentes¹. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Desarrollo de la Montaña. e-mail: karen@cdm.gtmo.inf.cu

²Centro de Bioplantas. Carretera a Morón Km 9. Ciego de Ávila. Cuba

RESUMEN

La ruda (*Ruta graveolens*, L) es una planta medicinal con reconocidas propiedades terapéuticas, la misma ha sido encontrada como escasa dentro de las veinte plantas medicinales no abundantes en la provincia Guantánamo, Cuba. Ante esta situación las técnicas del cultivo de tejidos constituyen una solución en aras de mantener la biodiversidad del entorno. Para el establecimiento de una metodología de propagación *in vitro* se hace necesario el estudio de varios factores que influyen en el desarrollo del proceso de regeneración de la nueva planta es por ello que la presente investigación se realizó en el Centro de Desarrollo de la Montaña con el objetivo de estudiar la concentración de 6-BAP, el período y el número de subcultivos para la multiplicación *in vitro* de *Ruta graveolens* a través de la organogénesis directa. Para ello se emplearon segmentos nodales con una yema axilar. Los mismos fueron inoculados en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog. Los resultados mostraron que la multiplicación de segmentos nodales de ruda en medio de cultivo MS con 25g.l⁻¹ de sacarosa, sin 6-BAP con cuatro subcultivos cada 21 días permitió la obtención de un alto coeficiente de multiplicación.

Palabras clave: multiplicación *in vitro*, MS, organogénesis, ruda

ABSTRACT

The rue (*Ruta graveolens*, L) it is a medicinal plant with grateful therapeutic properties, it has been found as scarce, into the twenty medicinal plants not abundant in Guantánamo province, Cuba. Before this situation the techniques of the tissue cultivation constitute a solution to maintain the environment biodiversity. For the establishment of a propagation methodology *in vitro*, it necessary the study of different factors that influence in the generation process development of the new plant; for the reason the present research was development in Centro de Desarrollo de la Montaña with the objective to study the concentration of 6-BAP, the period and the subcultivation number for the multiplication of *Ruta graveolens in vitro* through the direct organogenesis. Were used nodal segments with an axillary buds. The results showed that the multiplication of nodal segments of rue in MS cultivation supplemented with 25g.l⁻¹ of sucrose, without 6-BAP, with four subcultivation every 21 days, it allowed a higher multiplication coefficient.

Key words: *in vitro* multiplication, MS, organogenesis, rue

INTRODUCCIÓN

La ruda (*Ruta graveolens*, L) es una hierba perenne y glauca de reconocidas propiedades terapéuticas (Massot, 2000). Previene toda clase de hemorragias porque fortalece la pared de los vasos sanguíneos, empleándose en la cirugía ocular (Trovato *et al.*, 2000). Ejerce además una notable acción sobre las fibras musculares uterinas, es antihelmíntica, antiespasmódica, vasoprotectora e hipertensora (Guarrera *et al.*, 1999). Es empleada en la producción de jabones para el control de insectos ectoparásitos (Castro *et al.*, 2000). Posee en sus raíces compuestos algicidas y antifúngicos de importancia para la agricultura (Meepagala *et al.*, 2005).

Estudios fenológicos realizados en Topes de Collantes señalan para la ruda la posibilidad de

florecer y fructificar, llegando a obtenerse semillas viables, lo que no se comporta de igual forma para la mayoría de las regiones del país, conllevando a que como práctica común se realice su multiplicación vegetativa fundamentalmente a través de estacas hechas de las ramas a pesar de las bajas posibilidades de éxito que se tienen (Rodríguez y Lemes, 2000). Lo explicado anteriormente ha contribuido a que en la provincia Guantánamo, esta especie haya sido encontrada como escasa dentro de las veinte plantas medicinales no abundantes (CITMA, 1998).

Debido a la importancia que tiene esta planta es interés para el Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP) poder contar con la materia prima suficiente para la elaboración de medicamentos. Como se conoce algunas plantas medicinales con

gran demanda, son difíciles de propagar por métodos convencionales. Para estas especies la biotecnología juega un importante papel. Entre los procesos biotecnológicos, la micropropagación, es quizás uno de los más estudiados, de mayor avance y que más se ha aplicado a nivel comercial. A partir de pequeñas secciones de tejidos vegetales es posible regenerar plantas completas, lo que hace que sea impostergable su empleo en la propagación y conservación de especies escasas en la naturaleza.

Teniendo en cuenta la necesidad de incrementar las áreas dedicadas al cultivo de la ruda, las ventajas que ofrece la técnica de micropropagación en la propagación masiva de plantas y la importancia que juegan cada uno de los parámetros dentro de un protocolo de propagación *in vitro*, el presente trabajo se propuso determinar la influencia del 6-BAP, el período y el número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de *Ruta graveolens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM), en el período comprendido de Junio de 1999 a Junio de 2001.

Como material vegetal inicial para el establecimiento *in vitro* se utilizaron segmentos nodales de ruda, sin hojas, con 5.0 a 10mm de longitud que contenían una yema axilar y procedían del banco de donantes establecido en condiciones semicontroladas (casa de cultivo). Estos fueron lavados con detergente al 1% durante 5 minutos y se mantuvieron en agitación a 100rpm. Los enjuagues se realizaron con abundante agua destilada estéril (tres a cuatro veces). Posteriormente, fueron establecidos en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) con 25g.l⁻¹ de sacarosa y el pH fue ajustado a 5.6 con NaOH (m/v) y HCl (v/v) a una concentración de 1.0N antes de ser esterilizado en autoclave vertical a 121kgfcm⁻² durante 15 minutos. En todos los casos el medio de cultivo se solidificó con 0.6% de agar técnico # 3 y fue distribuido a razón de 5.0ml en tubos de ensayo de 15x25mm. La incubación se efectuó en una cámara de cultivo con 25± 2°C e iluminación solar (25-43.75µm m⁻² s⁻¹).

Al cabo de 21 días de cultivo, los brotes obtenidos (adventicios: que aparecieron en la base del segmento nodal empleado como explante inicial y el axilar: que surgió a partir de la yema axilar que poseía el explante inicial) fueron separados del tejido original, se dividieron por segmentos nodales (cada segmento nodal con una yema axilar constituyó un explante) que fueron colocados en

frascos de cultivo de 250ml de capacidad y 20ml de medio de cultivo. Para cada una de las variantes dentro de los experimentos se emplearon 10 frascos de cultivo con tres explantes en cada recipiente, distribuidos en un diseño completamente al azar. Todos los experimentos fueron repetidos tres veces. Fue utilizado como medio de cultivo basal el empleado para el establecimiento. Los mejores resultados de cada experimento constituyeron puntos de partida para el experimento posterior. El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el empleo del paquete estadístico Statgraphic. Versión 5.1.

Efecto de diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) en la multiplicación de ruda

Con el objetivo de determinar la concentración de 6-BAP más efectiva para la multiplicación de brotes de ruda establecidos *in vitro*, se evaluaron cuatro concentraciones (0.2, 0.35, 0.50 y 1.0mg.l⁻¹) que constituyeron los tratamientos. Como tratamiento control se utilizó medio de cultivo sin regulador del crecimiento.

A los 21 días de cultivo, se midió la longitud promedio del brote surgido de la yema axilar en el explante inicial (LBYa/EI) (mm). Además, se contabilizó el número de segmentos nodales en el brote procedente de la yema axilar/por explante inicial (NsnBYa/EI) y el número de segmentos nodales en los brotes adventicios/por explante inicial (NsnBa/EI). Los explantes que se obtuvieron se contaron y con ello se calculó el coeficiente de multiplicación de acuerdo con la fórmula: CM (coef. multip.) = número de explante final / número de explante inicial.

Los datos fueron procesados mediante un ANOVA simple donde las medias fueron comparadas por la prueba de rangos múltiples de Duncan para el 5% de probabilidad de error.

Influencia del período de tiempo entre subcultivos en la multiplicación de la ruda

Se evaluó el efecto del tiempo entre subcultivos en el coeficiente de multiplicación de la ruda. Los subcultivos se realizaron a los 7, 14, 21 y 28 días. Los datos fueron procesados a través de un ANOVA simple y las medias fueron comparadas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan para el 5% de probabilidad de error.

Influencia del número de subcultivos en la multiplicación de ruda

Para determinar la influencia del número de subcultivos en la multiplicación de la ruda, se evaluó cada 21 días y durante cinco subcultivos,

el número de brotes totales emitidos. La muestra inicial fue de 30 repeticiones (30 frascos). Los datos fueron procesados a través de un ANOVA simple y las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan para el 5% de probabilidad de error.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) en la multiplicación de ruda

Las concentraciones de 6-BAP utilizadas en el medio de cultivo influyeron sobre la multiplicación de *Ruta graveolens*. Se observó que a bajas concentraciones de la citocinina aumentó el número de brotes adventicios por explante inicial y el coeficiente de multiplicación (Tabla 1) en tanto el número de segmentos nodales en el brote procedente de la yema axilar en el explante inicial y la longitud del brote disminuyeron. Este último resultado difiere de los encontrados por González *et al.* (2002) al evaluar la influencia del 6-BAP sobre el comportamiento *in vitro* de plantas de Henequén (*Agave fourcroydes*) obtenidas a partir de embriones, en las cuales en la medida que se disminuyó el nivel de citocinina se incrementó significativamente la altura.

Faisal *et al.* (2005) observaron mayor regeneración de brotes en segmentos nodales de ruda (*Ruta graveolens*) con el empleo de medio de cultivo MS con 10µM de Benciladenina y 2.5µM de ácido naftalenacético (ANA).

El tratamiento control (0mg.l⁻¹ de 6-BAP) mostró los mejores resultados, ya que aunque la longitud del brote difiere sólo de las concentraciones 0.2 y 0.35mg.l⁻¹ y no hay emisión de brotes adventicios, el número de segmentos nodales en el brote axilar del explante inicial es significativamente superior al resto de los tratamientos y el coeficiente de multiplicación mostró diferencias

estadísticamente significativa sólo del tratamiento donde se empleó el 6-BAP a una concentración de 0.35mg.l⁻¹.

Durante la fase de establecimiento no fue necesario la adición de reguladores del crecimiento al medio de cultivo para lograr la brotación de las yemas, lo que parece indicar que existe suficiente cantidad endógena de hormonas en los explantes, a lo cual pudiera atribuirse el hecho de que con el tratamiento control se obtuvieron los mejores resultados en la fase de multiplicación.

Resultados similares fueron obtenidos por Agramonte *et al.* (2001) en segmentos nodales de *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis*) quienes observaron un efecto positivo del 6-BAP en el número de brotes, y refieren que las altas concentraciones indujeron un fuerte ahijamiento y reducción del tamaño de los mismos. Por su parte, Montes y Rodríguez (2001), durante el establecimiento y brotación *in vitro* de yemas axilares y ápices de ginkgo (*Ginkgo biloba*, L) observaron que en los tratamientos donde había mayor número de brotes estos tenían menor longitud.

Influencia del período entre subcultivos en la multiplicación de la ruda

A medida que se incrementó el tiempo entre subcultivos se observó aumento en los valores de la variable evaluada, hasta los 21 días de cultivo, a partir del cual se observó una estabilidad hasta los 28 días (Figura 1).

A los 21 y 28 días de cultivo no hubo diferencias en el coeficiente de multiplicación, de lo que se puede inferir que el subcultivo debe hacerse en este período. Se debe destacar que a los 28 días algunos explantes mostraron síntomas de marchitez, lo que pudiera ser atribuido al agotamiento del medio de cultivo, que provocó un cese gradual de los procesos metabólicos en los explantes, de lo que dependieron además los resultados para las variables evaluadas en este período.

Tabla 1. Influencia de la concentración de 6-BAP en la multiplicación *in vitro* de *Ruta graveolens*

6-BAP (mg.l ⁻¹)	LBYa (mm)	NsnBa/EI	NsnBYa/EI	CM
0	30.8a	0c	4.6a	4.6a
0.2	16.5b	3.3a	1.5e	4.8a
0.35	18.9b	1.6b	1.6d	3.2b
0.5	21.1ab	1.4b	2.5c	3.9ab
1	22.9ab	1.06b	2.64b	3.7ab
MG ± EE	22.0 ± 0.2528	1.47 ± 0.1645	2.56 ± 0.03811	4.04 ± 0.3707

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente entre sí para Duncan $p < 0.05$.

Aunque el tiempo de subcultivo depende entre otros factores del genotipo, el medio de cultivo y las condiciones de incubación, en otras especies se han encontrado resultados similares. Fournier y Cala (2000) en la propagación del jengibre (*Zingiber officinale*) observaron que el ciclo de los subcultivos puede realizarse entre los 14 y 21 días después de efectuada la siembra, ya que a partir de ese tiempo no hubo diferencias entre los tratamientos, en cuanto a la cantidad de brotes por explante.

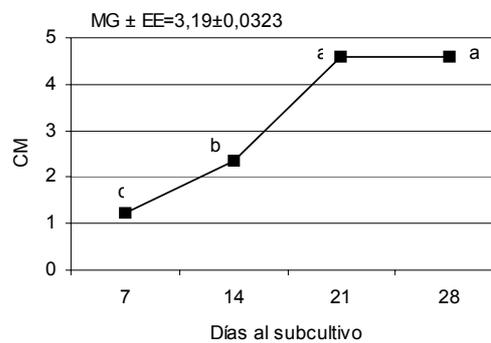
Otros autores como Licea *et al.* (2001) realizaron los subcultivos en la fase de multiplicación de la caña santa (*Cymbopogon citratus*) cada 21 días. Por otro lado, Gallardo *et al.* (2002) al estudiar el período para el subcultivo en la micropropagación del híbrido cubano de papaya IBP 42-99 a los 24 y 30 días, comprobaron que con el incremento en días no aumentó significativamente el número de brotes axilares, la altura de las plantas, ni el vigor de las mismas y destacaron que esto podía deberse a un agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo a partir de los 24 días.

Influencia del número de subcultivos en la multiplicación de ruda

El coeficiente de multiplicación se incrementó, de manera estable, desde el primer hasta el cuarto subcultivo (Figura 2).

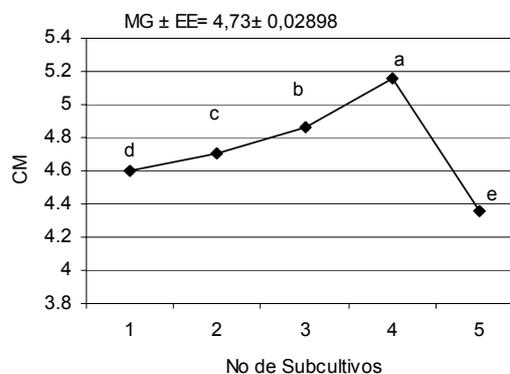
En el quinto subcultivo se produjo un decrecimiento, elemento a tener en cuenta para definir el número de subcultivos. Fue significativa la diferencia que mostró el cuarto subcultivo comparado con el resto, lo que evidencia que este puede ser el óptimo para agotar la multiplicación en un momento que se alcanzó un índice de multiplicación de 5.16. La influencia que ejerce el número de subcultivos en la multiplicación puede estar asociada en parte al genotipo. Es por ello que resulta diferente cuando se analiza el comportamiento de otras especies. Por ejemplo, Licea *et al.* (2001) en trabajos desarrollados en caña santa refirieron que este comportamiento puede estar relacionado también con los niveles endógenos de 6-BAP que han ido acumulando los brotes.

Así mismo, Jiménez *et al.* (1995) observaron que para la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido), en los primeros subcultivos el coeficiente de multiplicación era más bajo, pero a partir de la tercera o cuarta multiplicación comenzaba el incremento de este. De igual forma, el aumento de la cantidad de brotes en el jengibre fue sostenido hasta el décimo subcultivo, provocado quizás por un efecto de adaptación de los tejidos al crecimiento en el medio de cultivo según describió Fournier y Cala (2000). También, Licea *et al.* (2001) observaron un incremento de la cantidad de yemas axilares desde el primer subcultivo hasta el quinto cuando cultivaron brotes de caña santa en medio de cultivo MS.



Medias con letras iguales no difieren estadísticamente entre sí para Duncan $p < 0.05$

Figura 1. Influencia de los días al subcultivo sobre el coeficiente de multiplicación *in vitro* de *Ruta graveolens*



Medias con letras iguales no difieren estadísticamente entre sí para Duncan $p < 0.05$

Figura 2. Influencia del número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de *Ruta graveolens*

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que fue posible multiplicar *in vitro* *Ruta graveolens* en medio de cultivo MS sin regulador del crecimiento. Además se comprobó que se requieren cuatro subcultivos cada 21 días para alcanzar los mayores índices de multiplicación de esta especie.

REFERENCIAS

- Agramonte, D, Delgado, LF, Trocones, Ana B, Pérez, Martha P, Ramírez Daymí A, Gutiérrez, OM (2001) Micropropagación de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales. Biotecnología Vegetal 1 (2): 109-114
- Castro R L (2000) Micropropagation of *Ruta graveolens*. Horticulturae: II Wocmap Congress Medicinal and Aromatic Plants Part 3 Agricultural Production Post Harvest Techniques Biotechnology. 502
- CITMA (1998) Inventario de especies medicinales del Macizo Nipe-Sagua-Baracoa. Boletín. La Habana
- Faisal, M, Ahmad, N, Anis, M (2005) *In vitro* regeneration and mass propagation of *Ruta graveolens* L. - a multipurpose shrub. HortScience 5 (40): 1478-1480
- Fournier Eida y Cala Marlene (2000) Establecimiento *in vitro* del jengibre (*Zingiber officinale*). Cuadernos de Fitopatología 73 (1723-1984): 6-10
- Gallardo JC, Posada LP, Gómez RK, Más LC, Reyes M, Herrera IO (2002) Micropropagación del híbrido Cubano de Papaya IBP 42-99. Biotecnología Vegetal 2 (4): 235-238
- González G, Alemán S, Trujillo R, Domech, R, Abreu E, Pérez Y (2002) Influencia de 6 Bencilaminopurina sobre el comportamiento *in vitro* de plantas de Henequén (*Agave fourcroydes*) obtenidas a partir de embriones. Biotecnología Vegetal 2 (4): 235-238
- Guarrera P, M (1999) Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in central Italy. Journal of Ethnopharmacology Roma, 68 : 183 – 192
- Jiménez, A (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum ssp.* Híbrido). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las plantas. Universidad Central de las Villas. 93 p.
- Licea R, Fernández Maité, Alvarado Karen, Gómez R (2001) Influencia de la concentración de agar sobre la multiplicación *in vitro* de *Cymbopogon citratus* (DC). Biotecnología Vegetal 1(2): 77-81
- Masot, B., Milesi, S., Gontier, E Bougard, F y Guckert, A (2000) Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagation shoots of *Ruta graveolens*. Plant Cell Tiss. and Organ Culture 62: 11-19
- Meepagala, K, Schrader, K, Wedge, D, y Duke S (2005) Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. Phytochemistry 22 (55): 2689-2695
- Montes, J y Rodríguez, J (2001) Establecimiento y brotación *in vitro* de yemas axilares y ápices de ginkgo (*Ginkgo biloba*, L). Chapingo. Serie Horticultura VII (1): 49-54
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-497
- Rodríguez, F y Lemes, C (2000) Estudio de la propagación vegetativa de la ruda (*Ruta graveolens*, L). Revista cubana de plantas medicinales 5(2): 56-59
- Trovato A, Monforte MT, Forestieri AM, Pizzimenti F (2000) *In vitro* antimycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids. Bellettino Chimico Farmaceutico. 139(85): 225-227