

TALLER LEÑOSAS

AVANCES EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE ESPECIES LEÑOSAS Y FORESTALES EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

Raúl Barbón*, Daniel Agramonte, Raúl Collado, Felipe Jiménez-Terry, Elisa Quiala, Marta Pérez, Odalys Gutiérrez, Elio Jiménez, Manuel de Fera, Maité Chávez, Ana Trocones, Luis Delgado, Alina Capote, José Enrique Salas. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: raulb@ibp.co.cu

RESUMEN

El Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) en su tarea de implementar y promover la sostenibilidad de los recursos forestales y agroforestales, ha desarrollado numerosos estudios para la caracterización, propagación y conservación de estos recursos genéticos, apoyándose en la biotecnología. El cultivo *in vitro* es una herramienta bien justificada para la micropropagación y la conservación de especies de difícil propagación, e individuos élite seleccionados que ya posee una serie de ventajas comparativas (altas tasas de multiplicación, automatización, clonación y rejuvenecimiento progresivo) con respecto a otros sistemas de propagación. Las actividades de micropropagación de especies leñosas y forestales se iniciaron con estudios de la organogénesis y la embriogénesis de diferentes especies tales como, café (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo, *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, *Coffea canephora* var. Robusta), guayaba (*Psidium guajava* L.), teca (*Tectona grandis* L.), pino (*Pinus caribaea*), caoba (*Swietenia macrophylla*), majagua (*Hibiscus elatus* L.), morera (*Morus alba* L.) y *Eucalyptus* spp. La principal limitante del cultivo de estos materiales vegetales es la alta incidencia de contaminantes microbianos durante la introducción *in vitro*. Sin embargo, la aplicación de tratamientos de desinfección superficial ha permitido en parte resolver el problema. Durante las investigaciones realizadas se logró el establecimiento en condiciones de cultivo *in vitro* de segmentos nodales y ápices de las diferentes especies leñosas y forestales provenientes de brotes epicórmicos de plantas de campo o bancos de explantes en condiciones semicontroladas. El material vegetal establecido *in vitro* sirvió como fuente de explantes para las investigaciones de la organogénesis y la embriogénesis somática. Las investigaciones desarrolladas en la micropropagación de estas especies han permitido ampliar la información existente sobre el comportamiento *in vitro* de especies de difícil propagación como son las leñosas tropicales y forestales. Esto ha generado material para enseñanza y capacitación. La micropropagación tiene muchas ventajas si se cuenta con protocolos repetibles, puede ser una herramienta muy valiosa en las diferentes etapas del mejoramiento genético forestal implicando una ganancia en tiempo y recursos durante la multiplicación clonal.

Palabras clave: agroforestales, micropropagación, recursos forestales

ADVANCE IN THE *IN VITRO* CULTURE OF WOODY AND FOREST SPECIES IN THE INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

ABSTRACT

The Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) in their task of to implement and to promote the sustainability of the forest resources and agroforest, it has developed numerous studies for the characterization, propagation and conservation of these genetic resources, leaning on in the biotechnology. The *in vitro* culture is a very justified tool for the micropropagation and conservation of species of difficult propagation, and selected individuals elite. The micropropagation represents a series of comparative advantages (discharges multiplication rates, automation, clonation and progressive reinvigorating) with regard to other propagation systems. The activities of micropropagation of woody and forest species began with studies of the organogenesis and somatic embryogenesis of different species like, coffee (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo, *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, *Coffea canephora* var. Robust), guava (*Psidium guajava* L.), teak (*Tectona grandis* L.), pine (*Pinus caribaea*), mahogany (*Swietenia macrophylla*), majagua (*Hibiscus elatus* L.), morera (*Morus alba* L.) and *Eucalyptus* spp. The main obstacle for the culture of these materials is the high incidence of microbial contaminant during the *in vitro* introduction. However, the application of strong treatments of superficial disinfection has allowed partly solving the problem. During the carried out investigations the sprouting was achieved under *in vitro* culture conditions of nodal segments and apexes of the different woody and forest species coming from epicormics shoots of field plants or plants under controlled conditions. The *in vitro* established plant material was good as explantes source for the investigations of the organogenesis and the somatic embryogenesis.

The investigations developed in the micropropagation of these species they have allowed to enlarge the existent information on the behavior *in vitro* of species of difficult propagation like they are the woody ones tropical and forest. This has generated material for teaching and training. The micropropagation has many advantages if it is had protocols repeatable, it can be a very valuable tool in the different stages of the forest genetic improvement implying a gain in time and resources during the multiplication clonal

Key words: agroforest, forest resources, micropropagation

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN *SWIETENIA MACROPHYLLA* KING

Raúl Collado*, Raúl Barbón, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez-Terry, Martha Pérez, Odalys Gutiérrez.
*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. Cuba. e-mail: raulc@ibp.co.cu

RESUMEN

En *Swietenia macrophylla* King, la propagación por vías tradicionales no resuelve la necesidad de material vegetal para fomentar nuevas plantaciones. Esta especie es difícil de propagar mediante el cultivo de tejidos y no se cuenta con un sistema vía organogénesis repetible, debido básicamente a problemas de contaminación microbiana, oxidación fenólica y muerte de los tejidos en la fase de establecimiento de los explantes *in vitro*. Ello que hace necesario la búsqueda de un nuevo método de propagación. Con el objetivo de establecer la embriogénesis somática directa de *Swietenia macrophylla* King en medios de cultivo semisólidos se emplearon como material vegetal inicial embriones cigóticos inmaduros. Se estudiaron tres concentraciones de 2,4-D (2.0, 4.0 y 6.0 mg.l⁻¹) combinado con 1.0 mg.l⁻¹ de kinetina, para lograr la formación de embriones somáticos. Se determinó a las seis semanas de cultivo, el número de explantes con embriogénesis somática de alta frecuencia y baja frecuencia. Para que los embriones somáticos en etapa globular alcanzaran las etapas finales de torpedo y cotiledonal, estos se colocaron en tres tratamientos con 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg.l⁻¹) y un control sin reguladores de crecimiento. A los 30 días de cultivo se evaluaron el número de embriones somáticos que alcanzaron las etapas de torpedo y cotiledonal. Los mayores porcentajes de embriones cigóticos que desarrollaron embriogénesis somática de alta frecuencia y de baja frecuencia (41.02 y 20.51%), se obtuvieron con 4.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg.l⁻¹ de kinetina. Con 0.4 mg.l⁻¹ de 6-BAP se obtuvieron porcentajes de embriones somáticos en etapas de torpedo y cotiledonal (7.4 y 91.7 %) superiores al resto de los tratamientos. Los resultados demostraron el efecto positivo de la combinación del 2,4-D con la kinetina sobre la inducción de la embriogénesis somática directa. El 6-BAP estimuló el desarrollo de los embriones somáticos.

Palabras clave: caoba, embriones somáticos, reguladores de crecimiento

ABSTRACT

In the *Swietenia macrophylla* King, the propagation by traditional routes does not solve the necessity of plant material to foment new plantations. The propagate of this species by tissue culture is difficult and there is not a system via replicate organogenesis, due basically to microbial contamination problems, phenolic oxidation and death of tissues in the phase of *in vitro* establishment of explantes. For these reason a new method for its propagation is necessary. Aimed to establish direct somatic embryogenesis of *Swietenia macrophylla* King in semisolid culture medium, zygotic embryos were used as initial explants. Three concentrations of 2,4-D (2.0, 4.0 and 6.0 mg.l⁻¹) combined with 1.0 mg.l⁻¹ of kinetin were studied to obtain somatic embryos formation. After six weeks of culture the number of explants with high and low frequency of somatic embryogenesis were evaluated. Since the somatic embryos in globular stage reached the final stages of torpedo and cotyledonal, these were placed in three treatments with 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg.l⁻¹) and they were compared with a culture medium without growth regulators. At 30 days of culture the number of somatic embryos that reached the torpedo and cotyledonal stages were evaluated. The best percentages of zygotic embryos that development high and low frequency of somatic embryogenesis (41.02 y 20.51%), were obtained with a 4.0 mg.l⁻¹ of 2,4-D and 1.0 mg.l⁻¹ of kinetin. Percentages of somatic embryos at stages of torpedo and cotyledonal (7.4 y 91.7 %) superior to the rest of the treatments were obtained with 0.4 mg.l⁻¹ of 6-BAP. The results demonstrated the positive effect of combining 2,4-D with the kinetin on the induction of the direct somatic embryogenesis. The 6-BAP stimulated the development of the somatic embryos.

Key words: growth regulators, mahogany, somatic embryos

OBTENCIÓN *IN VITRO* Y ACLIMATIZACIÓN DE BROTES AXILARES DE LA ESPECIE *PINUS CUBENSIS* GRISEB

Raima Cantillo Ardebol*, Luis Rodríguez de Francisco, Omar Guadalupe Alvarado, Camila Rosales, Janet Igarza, Argelio Pifferrer, Ana M. Ochoa. * Autor para correspondencia.

*Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT), Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Gaveta Postal # 41. Código Postal # 80 100. e-mail: rayma@cbv.holguin.inf.cu

RESUMEN

La Meseta Pinares de Mayarí es el hábitat de la especie *Pinus cubensis* Griseb., endémica de la región, amenazada por minería y explotación maderera. Comenzando los años sesenta del siglo pasado se desarrolló una técnica para la reproducción de plantas por cultivo de tejidos, que se fue modificando para numerosas especies. Una de las técnicas de micropropagación más comunes y la más recurridas para iniciar trabajos con alguna nueva especie, es la formación de brotes axilares seguido del enraizamiento de los mismos. Al no existir una metodología para la micropropagación de *Pinus cubensis*, que satisfaga la demanda de semillas en el país para planes de reforestación en áreas minadas y de explotación forestal, se establece como objetivo de este trabajo: Lograr la multiplicación de *Pinus cubensis* mediante la formación de brotes axilares y su aclimatización. Como explante se utilizaron plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de embriones escindidos. El medio de cultivo basal empleado fue MS, con 30g.l⁻¹ de sacarosa y 7g.l⁻¹ Agar. Previo a la siembra se les realizó una herida en la base apical para estimular la formación de brotes axilares. Se probaron diferentes combinaciones de distintos tipos de reguladores del crecimiento. Para el enraizamiento y aclimatización se aislaron los vástagos obtenidos en la inducción de brotes y se les aplicó un golpe auxínico. Luego, con el objetivo de enraizarlos *ex vitro*, se les aplicó polvo enraizador y se sembraron en Peat Moss y Perlita (2:1) y se mantuvieron en caseta de adaptación. Todos los tratamientos produjeron brotes siendo el mejor la combinación de 22.5 ì M de 6-BAP + 5.4 ì M. Se logró un 50% de supervivencia, considerado adecuado para una conífera. De esta forma se logra por primera la obtención *in vitro* de brotes de *Pinus cubensis* y se logra la aclimatización exitosa de los mismos.

Palabras clave: aclimatización, brotes axilares, forestales, multiplicación

IN VITRO OBTENTION AND ACCLIMATIZATION OF AXILARY SHOOTS OF *PINUS CUBENSIS* GRISEB. SP.

ABSTRACT

The Plain of Pinares de Mayarí is the habitat of *Pinus cubensis* Griseb., endemic from the region, threatened by mining and wood industry. In the beginning of 60's a tissue culture technique for plant reproduction was developed. It was modified for several species. One of the micropropagation techniques most common, and most used to initiate works with new species, is the axillary shoots formation with rooting. Not existing a methodology to *Pinus cubensis* micropropagation, that satisfy the needs of seeds for reforestation in mining and wood exploitation areas, the following goal is set: to achieve *Pinus cubensis* multiplication by axillary shoots formation and their acclimatization. As explant it was used plantlets obtained from excised embryos *in vitro* germinated. Basal medium was MS, supplemented with sucrose 30 g.l⁻¹ and Agar 7g.l⁻¹. Before the planting a cut in explant apical base was made, to stimulate axillary shoots formation. It was tested several combinations and different kinds of plant growth regulators. To rooting and acclimatization, cuttings from shoots induction were isolated and put into auxinic shock. Then, to achieve *ex vitro* rooting, it was used rooting powder and planted in Peat Moss and Perlita (2:1) and then placed into adaptation room. Shoots were produced in all treatments, being the best 22.5 ì M de 6-BAP + 5.4 ì M combination. It was achieve a 50% of surviving, considered accurate to a conifer. Thus, for first time *in vitro* shoots from *Pinus cubensis* and their successful acclimatization are obtained.

Key words: acclimatization, axillary shoots, forestry, multiplication

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *HIBISCUS ELATUS* SW

Felipe Jiménez-Terry*, Daniel Agramonte, Ana Trocones Boggiano, Luis Delgado Martínez, Martha Pérez, Odalis Gutiérrez, Raúl Collado, Raúl Barbón. * Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e-mail: felipe@ibp.co.cu

RESUMEN

Entre las especies forestales más explotadas se encuentra *Hibiscus elatus*. La propagación de esta especie ha sido muy engorrosa; debido a la poca disponibilidad y viabilidad de las semillas. En los trabajos relacionados con la micropropagación de la majagua solo se han logrado resultados preliminares. Con el objetivo de desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* de *Hibiscus elatus* se emplearon como explantes iniciales yemas axilares. En el establecimiento *in vitro* se estudiaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de desinfección de los explantes. Se evaluó el efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP con ácido indolacético (AIA). Se determinó la supervivencia y el número de explantes brotados. Para determinar el coeficiente de multiplicación de los explantes se estudió la influencia de combinaciones de 6-BAP con ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y Biobras-6. En la fase de enraizamiento se evaluó la influencia de ANA y AIB y se cuantificó el número de plantas enraizadas. Posteriormente se estudiaron diferentes sustratos durante la aclimatización de las plantas propagadas *in vitro*. Las variables evaluadas fueron, supervivencia, longitud del tallo y número de entrenudos. Se logró un 65% de supervivencia cuando se empleó NaOCl al 1.5% durante 10 minutos, con 0.5 mg.l⁻¹ 6-BAP y 1.0 mg.l⁻¹ de AIA se alcanzó un 85% de brotación de los explantes. Cuando se combinaron 0.25 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 1.0 mg.l⁻¹ de ANA, se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 3.5. El 80% de las plantas *in vitro* enraizaron cuando se adicionó al medio de cultivo 1.5 mg.l⁻¹ de ANA. Las plantas transferidas a un sustrato compuesto por Casting (85%) y Zeolita (15%) presentaron un 90% de supervivencia. Se logró desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* de *Hibiscus elatus* desde el establecimiento *in vitro* de los explantes hasta la fase de aclimatización.

Palabras clave: majagua, micropropagación, reguladores de crecimiento

IN VITRO PROPAGATION OF HIBISCUS ELATUS SW**ABSTRACT**

Hibiscus elatus is among the most important forest species. The propagation of this species has been very troublesome due to the little availability and viability of the seeds. In the works related to the micropropagation of majagua single preliminary results have been obtained. With the objective to develop a methodology for the *in vitro* propagation of *Hibiscus elatus*, axillary buds were used as initial explants. In the *in vitro* establishment three concentrations of hypochlorite of sodium and three times of disinfection of the explants were studied. The effect of different combinations from 6-bap with indolacetic acid (AIA) were evaluated. The survival and the number of sprouted explants were determined. In order to determine the coefficient of multiplication of the explants, the influence of combinations of 6-BAP with naftalenacetic acid (ANA), indolbutiric acid (AIB) and Biobras-6 were studied. In the rooting phase the influence of ANA and AIB was evaluated and the number of plants with roots were quantified. Later, different substrates were studied during the phase of acclimatization from the plants propagated *in vitro*. The variables, survival, length of the stem and number of internodes were evaluated. A 65 % of survival was obtained when NaOCl to the 1,5% was used during 10 minutes, with 0,5 mg.l⁻¹ of 6-bap and 1,0 mg.l⁻¹ of AIA a 85% sprouting of the explantes was reached. When 0,25 mg.l⁻¹ of 6-bap and 1,0 mg.l⁻¹ of ANA were combined, a coefficient of multiplication of 3.5 was obtained. The 80% of the *in vitro* plants presented root when 1,5 mg.l⁻¹ of ANA was added to the culture medium. Plants transferred to a substrate composed by Casting (85%) and Zeolite (15%) showed a 90% of survival. A methodology for the *in vitro* propagation of *Hibiscus elatus* from the *in vitro* establishment of the explantes to the phase of acclimatization was developed.

Key words: growth regulators, micropropagation

PROPAGACIÓN IN VITRO DE MORUS ALBA L. EN MEDIO DE CULTIVO SEMISÓLIDO

Salas, BJE^{1*}, D. Agramonte², R. Barbón², F. Jiménez-Terry², R. Collado², M. Pérez², O. Gutiérrez². * Autor para correspondencia.

¹Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. km 3 carretera Cárdenas-Huimanguillo. CP 86 500. H. Cárdenas, Tabasco. México. e-mail: salas2001mx@yahoo.com.mx, salasj@colpos.mx

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. CP 54 830. Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

RESUMEN

Se utilizaron yemas apicales como explantes con el objetivo de propagar *in vitro* la morera en medio de cultivo MS semisólido con 6-BAP y KIN en su establecimiento y con diferentes combinaciones de 6-BAP con ANA en la multiplicación. Las plantas *in vitro* fueron evaluadas en fase de aclimatización y condiciones de campo. Es necesario adicionar al medio de cultivo MS basal 0.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP para inducir la brotación y para multiplicar la morera vía segmentos nodales se requiere un medio de cultivo MS con 0.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.5 mg.l⁻¹ de ANA. Se observó un 95% de supervivencia, 30.2 cm de altura, 9.8 hojas y 2.02 g planta de masa seca en la fase de aclimatización. En condiciones de campo se obtuvo un 97.5% de supervivencia 30 días después del trasplante y 233.1 cm de altura, 521.3 hojas, 19.2 tallos y 216.38 g de masa seca por planta en la última evaluación. Se logró la propagación *in vitro* de la morera como una alternativa para la producción de semilla.

Palabras clave: morera, propagación *in vitro*, yemas apicales

IN VITRO PROPAGATION OF MORUS ALBA L. IN SEMISOLID CULTURE MEDIUM**ABSTRACT**

Apical buds were used as explants with the objective to propagate *in vitro* the mulberry in semisolid MS medium supplemented with 6-BAP and KIN for the establishment and with different combinations of 6-BAP with ANA in the multiplication phase. *In vitro* plants were evaluated under acclimatization phase and field conditions. It is necessary to add the basal MS culture media with 0.5 mg.l⁻¹ of 6-BAP to induce the sprouting and to multiply the mulberry by nodal segments included 0.5 mg.l⁻¹ of 6-BAP and 0.5 mg.l⁻¹ of ANA in the medium. A 95% of survival, 30.2 cm of height, 9.8 leaves and 2.02 g plant of dry mass in the acclimatization phase was observed. Under field conditions 97.5% of survival 30 days after the transplant and 233.1 cm of height, 521.3 leaves, 19.2 stems and 216.38 g of dry mass per plant was obtained. *In vitro* propagation of mulberry was achieved as an alternative for plants production.

Key words: apical buds, *in vitro* propagation, morera

EMPLEO DE MARCADORES GENÉTICO-BIOQUÍMICOS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE CITRUS RESHNI HORT. EX TAN. TRATADOS CON PECTIMORF

Reina Margarita Hernández Ortiz*¹, Mercedes Lara², Esther Diosdado Salces³, Clara González³, María Isabel Román Gutierrez⁴, Marlyn Valdés de la Cruz³, Xonia Xiques³. * Autor para correspondencia.

*¹Centro Universitario Isla de la Juventud. Carretera Aeropuerto km 3 ½, Nueva Gerona, Isla de la Juventud. e-mail: rmargarita21@hotmail.com

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

³Facultad de Biología, Departamento de Biología Vegetal. Universidad de La Habana.

⁴Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales.

RESUMEN

El Pectimorf es un regulador del crecimiento no tradicional, se produce por la degradación parcial de la pared celular; presenta la característica de elicitar mecanismos de defensa propios de las plantas y/o actuar modificando los procesos de crecimiento y desarrollo de las mismas. Es sintetizado por el Laboratorio de Oligosacarinas del Departamento de Fisiología Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Este producto ha demostrado que no solo puede sustituir, de forma parcial o total, a los reguladores del crecimiento tradicionales, sino que, en la mayoría de los casos, se obtienen resultados superiores. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar por el empleo de seis sistemas isoenzimáticos cambios en el material vegetal bajo la acción del Pectimorf. Se utilizaron: óvulos, proembriones, embriones en los distintos estadios de desarrollo (globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar) y callos embriogénicos; tratados o no con Pectimorf a la concentración de 10 mg.l⁻¹. Se realizó la caracterización genético-bioquímica de los materiales empleados, mediante los sistemas isoenzimáticos: Peroxidasas, Polifenoloxidasas, Esterasas, Anhidrasa Carbónica, Fosfatasas Ácidas y Superoxidodismutasa. El estudio genético-bioquímico mostró un 84.04% de polimorfismo en los sistemas isoenzimáticos estudiados; donde Anhidrasa Carbónica resultó ser el sistema más polimórfico (90.04%). El análisis de Conglomerados (*cluster*) según el coeficiente de DICE, permitió formar tres grupos, en el primero aparecen los óvulos, que es el material de partida; mientras que en los restantes grupos

aparecen los tratamientos de acuerdo con las diferentes etapas del desarrollo morfogénico del material vegetal y a la expresión diferencial de los genotipos, en respuesta al empleo de este biorregulador del crecimiento.

Palabras clave: Isoenzimas, Mandarina Cleopatra, Pectimorf, Oligogalacturonidos

PROPAGACIÓN CLONAL DE ÁRBOLES DE TECA A TRAVÉS DEL CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*

Elisa Quiala*, Raúl Barbón, Manuel de Fera, Maité Chávez, Alfonso Pérez, Rafael Padrón, Mariana La O.

*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: elisa@ibp.co.cu

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación clonal de árboles de teca con más de 30 años de edad, seleccionados del banco de semillas «Las Tecas» (Empresa Forestal de Villa Clara). Para la propagación *in vitro* se emplearon medios de cultivo semisólidos y sistemas de inmersión temporal (SIT). Se estableció en fase de aclimatización un banco de plantas donantes obtenidas a partir de acodos aéreos realizados en ramas de plantas adultas y brotes epicórmicos de árboles, que sufrieron una poda severa a la altura de 50-70 cm, estos brotes fueron enraizados y mantenidos en condiciones de casa de cultivo. Para el establecimiento *in vitro* se evaluó la eficiencia de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) en la desinfección de los brotes. Los explantes establecidos fueron seccionados y multiplicados durante cinco subcultivos, con una frecuencia de 28 días, en un medio de cultivo semisólido MS con 1.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Para la multiplicación de los brotes en los SIT, se estudiaron diferentes parámetros como el tipo de explante, la frecuencia de inmersión y la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo. Las plantas fueron enraizadas *ex vitro* y plantadas en fase de aclimatización en cinco tipos de sustrato. El establecimiento del banco de plantas donantes solo se logró a partir de brotes epicórmicos con una y dos semanas de cultivo y de acodos con cuatro meses, los cuales fueron asperjados con solución enraizadora. Fue posible el establecimiento *in vitro* del 90% de los brotes cuando estos fueron sumergidos durante un minuto en etanol al 70% y posteriormente desinfectados con una solución de NaOCl al 2.0% durante 10 minutos. Los ápices fueron los explantes, que mostraron mejor respuesta en los SIT, el número de brotes se incrementó a medida que la frecuencia de inmersión diaria aumentó; sin embargo el número de plantas hiperhidricas también se incrementó en la misma medida. En los SIT el número de brotes por planta fue menor a medida que disminuyó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo, sin embargo hubo una mayor calidad de las plantas expresada en un incremento de la altura, el área foliar y el número de raíces, así como una disminución de la hiperhidricidad de las plantas. Se logró la aclimatización de los brotes obtenidos en los SIT.

Palabras clave: especies leñosas, micropropagación, sistemas de inmersión temporal, *Tectona grandis*

AVANCES EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE *GARCINIA ARISTATA*

Sagarra, Fernando*, M. Daquinta, O. Concepción, L. Nápoles, D. Pina. * Autor para correspondencia.

Laboratorio de Células y Tejidos Vegetales. Centro de Bioplasmas, UNICA, Carretera a Morón, km. 9, CP 69 450, Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: fsagarra@bioplasmas.cu

RESUMEN

El manajú (*Garcinia aristata*) es una especie leñosa endémica de Cuba muy utilizada en la medicina tradicional y considerada en peligro de extinción. Con el objetivo de establecer el cultivo *in vitro* de la misma, se evaluó el efecto de las concentraciones 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3% (m/v) de bicloruro de mercurio (HgCl₂) y de diferentes tiempos de aplicación, sobre la desinfección y supervivencia de hojas y ápices de árboles maduros tomados directamente del campo. Posteriormente se evaluó el comportamiento de ápices durante su establecimiento en medio de cultivo MS semisólido, con varias concentraciones de N₆-benciladenina (BA) sola y combinada con ácido indol-butírico (AIB) o ácido naftalenacético (ANA), en un rango de concentraciones. Con el objetivo de lograr un método de rejuvenecimiento eficiente para obtener material vegetal de partida con condiciones fisiológicas más adecuadas para próximos estudios, se realizó un experimento de brotación forzada de ramas en cámara húmeda. Se realizaron dos tratamientos en los que las ramas se colocaron en

zeolita saturada en agua destilada o en una solución de BA (222 μ M). Los mejores resultados se obtuvieron con 5 minutos de desinfección en HgCl₂ 0.05% para ambos tipos de explante. El mayor porcentaje de brotación (16.67%) durante el establecimiento se obtuvo con 4.44 μ M de BA, entre todas las variantes evaluadas de la citoquinina, sola o combinada con auxinas. Todos los tratamientos con BA, excepto el de menor concentración (2.22 μ M), provocaron la formación de callos alrededor de las yemas. Los porcentajes de formación de los callos aumentaron con la concentración de la citoquinina y disminuyeron al combinarla con ambos tipos de auxinas. La aparición de estos callos estuvo siempre asociada a la muerte del explante. La brotación de yemas axilares de estacas en cámara húmeda fue significativamente mayor con la aplicación de BA.

Palabras clave: brotación, citoquinina, desinfección, endémica, Manajú

ADVANCES ON THE *IN VITRO* CULTURE OF *GARCINIA ARISTATA*

ABSTRACT

Manajú (*Garcinia aristata*) is a threatened tree endemic from Cuba, commonly used for the traditional medicine. With the aim of establishing its *in vitro* culture, leaves and apical buds, used as explants, were taken from field-growing mature trees and treated with different concentrations (0.05, 0.1, 0.2 and 0.3% w/v) of mercuric chloride (HgCl₂) and for various time. The percentage of contamination and survival were evaluated. On a second experiment, the behaviour of apical buds was evaluated during its establishment on semisolid MS basal medium supplemented first, with a range of concentrations of N₆-benzyladenine (BA) and then, with the best treatment of BA in combination with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) or naphthaleneacetic acid (NAA). An experiment for forcing branches to sprout was done, in order to achieve an efficient rejuvenation method for obtaining plant material in better physiological conditions for next studies. Branches were placed within a humid chamber under two treatments: in zeolite saturated in distilled water or in a 222 μ M BA solution. The best results in surface sterilization were obtained with 0.05% HgCl₂ for 5 minutes in both explants type. The major percentage of explants producing shoots was obtained with BA 4.44 μ M among all the concentrations of the cytokinin evaluated, either single or in combination with auxins. Only in the treatment of 2.22 μ M BA (lowest concentration) was not observed the formation of callus around the bud. The percentage of formation of this kind of callus increased with the concentration of the cytokinin and decreased when combined with both type of auxins. The presence of the callus was always associated to the death of the explant. On the other hand, the outgrowth within humid chambers was significantly higher for the branches treated with BA.

Key words: cytokinin, endemic, shoots, sterilization

EFFECTO DEL AMBIENTE *IN VITRO* SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *COFFEA ARABICA* CV. CATURRA ROJO.

Raúl Barbón*¹, Walter Preil², Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: raulb05@ibp.co.cu

²Inst. Zierpflanzenzüchtung, Ahrensburg, Germany.

RESUMEN

Las investigaciones para el establecimiento de sistemas de regeneración vía embriogénesis somática y el aumento de la eficiencia de los mismos se ha centrado tradicionalmente en el estudio de los componentes del medio de cultivo, prestándosele poca atención a otros factores del ambiente *in vitro* como la composición de la atmósfera gaseosa. La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el efecto del dióxido de carbono sobre la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo. Los resultados demostraron que en los biorreactores, la configuración del vaso de cultivo y específicamente el sistema de aireación, influyó sobre la acumulación de CO₂. En los biorreactores con control sin ventilación forzada donde el CO₂ se acumuló hasta niveles de 2.8% en café, se alcanzó una producción mayor de embriones somáticos (74x10³ ES.l⁻¹) que en los biorreactores con ventilación forzada (56x10³ ES.l⁻¹). En el tratamiento de biorreactor con 5.0% de CO₂ se obtuvieron los mayores rendimientos (119.10³ ES.l⁻¹), aunque al emplearse ventilación forzada los resultados fueron superiores con diferencias estadísticas a la variante sin ventilación forzada. Al incrementar la concentración de CO₂ (2.5%) hubo una mayor síntesis de AGPs que coincidió con los valores más altos de producción de embriones somáticos, este hecho unido al efecto inhibitorio del proceso

embriogénico en presencia del reactivo de Yariv demostraron el papel de las AGPs en la morfogénesis vía embriogénesis somática.

Palabras clave: café, embrión somático, dióxido de carbono, suspensión celular

EFFECT OF THE *IN VITRO* ENVIRONMENT ON THE SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *COFFEA ARABICA* CV. CATURRA ROJO

ABSTRACT

The investigations for the establishment of plants regeneration system by somatic embryogenesis and the increment of the efficiency of the same ones has been centred traditionally on the study of the components of the culture medium, but a few attention to other factors such as the *in vitro* environment and the composition of the gaseous atmosphere. The present investigation was carried out to determine the effect of the dioxide of carbon on *Coffea arabica* L. cv. Caturra Rojo somatic embryogenesis. The results demonstrated that in the bioreactors the configuration of the glass of culture and specifically the system of air supply influenced in the accumulation of CO₂. In the bioreactors without forced ventilation (control) where CO₂ was accumulated up to levels of 2.8%, a major production of somatic embryos (74x10³ ES.l⁻¹) was reached in comparison with the bioreactors with forced ventilation (56x10³ ES.l⁻¹). The major yields (119.10³ ES.l⁻¹) were obtained in the treatment of bioreactor with 5.0% of CO₂, although when forced ventilation was applied the results were superior with statistical differences to the variant without forced ventilation. Increasing the concentration of CO₂ (2.5%) the synthesis of Arabinogalactanoproteins (AGPs) increased too and it is coincided with the highest values of production of somatic embryos, this fact joined the inhibitory effect of the process embryogenic in presence of Yariv's reagent they demonstrated the role of the AGPs in the morphogenesis by somatic embryogenesis.

Key words: carbon dioxide, cell suspension, somatic embryo

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ALTA FRECUENCIA EN CALLOS DE *PSIDIUM GUAJAVA* L VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18- 40, CULTIVADOS EN MEDIO LÍQUIDO

Oscar Concepción Laffitte^{1*}, Lelurllys Nápoles Borrero¹, Ninel Peralta Ballbé², Aurora Pérez Martínez², Reinaldo Trujillo Sánchez². * Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos.

²Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón, km 9, CP 69450. Ciego de Avila. Cuba. e-mail: oconcepcion@bioplasmas.cu

RESUMEN

Se indujo embriogénesis somática de alta frecuencia en callos embriogénicos de guayaba (*Psidium guajava* L) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 cultivados en medio líquido. Para la iniciación del cultivo se utilizaron embriones zigóticos inmaduros como explante inicial. En la inducción del callo embriogénico se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15 y 20 μmol) de 2,4-D, Picloram o Dicamba, como suplemento del medio de cultivo WPM. Para establecer el mantenimiento y/o proliferación del callo embriogénico se desarrolló un experimento en el cual los callos inducidos en dos concentraciones de 2,4-D (A=1.0 y B=1.5 mg.l⁻¹) se transfirieron a tres concentraciones diferentes del mismo regulador (A=1.0, B=1.5 y C=0.1mg.l⁻¹). Se realizaron tres subcultivos consecutivos cada 30 días en iguales condiciones. Dos grupos de callos inducidos en una y otra concentración de 2,4-D (A y B) no se subcultivaron durante todo el experimento. Callos embriogénicos se transfirieron a erlenmeyers de 50 ml con medio de cultivo líquido WPM con 1.5 mg.l⁻¹ de 2,4-D a razón de 100 mg de callo/ml. Luego de tres subcultivos por renovación total del medio sobrenadante cada 7 días, se realizó el cribado de los cultivos dando lugar a cuatro fracciones de acuerdo con el tamaño de los agregados: I (0-250 μm), II (250-500 μm), III (500-1000 μm) y IV (>1000 μm). Estas fracciones se subcultivaron cada 7 días durante 21 días, en medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. El 2,4-D y el Picloram (5 y 10 μmol) promovieron los mayores porcentajes de formación de callo embriogénico (84 y 80%), mientras que el Dicamba mostró resultados desfavorables. Durante el mantenimiento de los callos embriogénicos se describió el desarrollo morfológico del proceso y se determinó que los callos requieren ser mantenidos en medios de cultivo donde las concentraciones de la auxina se incrementen o se mantengan iguales a las utilizadas para la inducción. Para los tratamientos donde se realizó subcultivo de mantenimiento, la formación de ES, y en especial el número de ES/explante, fue bajo. En los tratamientos donde el 2,4-D fue disminuido de manera intensa durante el mantenimiento y en los que no se realizaron subcultivos de mantenimiento, los valores promedio del porcentaje de formación de ES y el número de ES/

explantes fueron significativamente los más altos. El cultivo de los callos en medio de cultivo líquido, permitió obtener un desarrollo morfológico de ES con alta frecuencia. Se observó que los ES en diversos estadios se mantenían sujetos por la región basal o radicular a un centro común que poseía una alta competencia embriogénica, el cual se denominó «matriz» dando lugar a estructuras semejantes a «estrellas». Al analizar la densidad de ES.ml⁻¹ de los diferentes tratamientos de acuerdo con el tamaño del agregado se pudo observar que las fracciones I y II alcanzaron el mayor valor (233 y 226 ES.ml⁻¹, respectivamente) y lograron también la mayor cantidad de ES en estadios avanzados. Los ES poseen más de un 95% de viabilidad en todas sus fases de desarrollo, mientras que la «matriz» no mostró viabilidad en ninguno de los casos muestreados. Los ES cosechados mostraron una excelente capacidad de germinación y conversión *in vitro*.

Palabras clave: auxinas, embriogénesis somática, guayaba, inducción de callos, mantenimiento de callos, medio de cultivo líquido

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF HIGH FREQUENCY ON *PSIDIUM GUAJAVA* L. VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18-40, CALLUS CULTURED IN LIQUID MEDIUM

ABSTRACT

Somatic embryogenesis of high frequency was induced in guava (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 calluses *in vitro* cultured in liquid medium. Immature zygotic embryos were used for callus induction as explant source and different concentrations (0, 5, 10, 15 and 20 μ mol) of 2,4-D, Picloram or Dicamba as supplement of WPM medium. For establishment the maintenance or proliferation cultures condition, calluses induced with two concentrations of 2,4-D (A=1.0 y B=1.5 mg.l⁻¹) were subcultured for three times with 30 days frequency to the same medium WPM but supplemented with three different concentrations of 2,4-D (A=1.0, B=1.5 y C=0.1mg.l⁻¹). A callus group, induced in both concentrations, was not subcultured during every times of experiment. In order to achieve a high regeneration frequency of somatic embryos (SE), the callus were transferred to 50 ml Erlenmeyer's vessels contained 10 ml of WPM liquid medium with 2,4-D 1.5 mg.l⁻¹ to 100 mg of callus per ml rate. After three subcultures each 7 days by removing the old media and addition of analogous freshly medium, during 21 days, the liquid cells cultured were sieved by three different meshes. Four fractions were obtained: I (0-250 μ m), II (250-500 μ m), III (500-1000 μ m) y IV (>1000 μ m). Each fraction was subcultured to MS basal medium without growth regulators, during 21 days with 7 days frequency of subculture. Somatic embryos (SE) density was evaluated and a viability analysis was performed using the excitation by UV light and FDA. The best embryogenic callus formation (84 y 80%) was promoted by 2,4-D and Picloram (5 and 10 μ mol), while the Dicamba showed unfavorable results. By the increase of mass fresh weight was determined that the best conditions for subculturing of embryogenic callus during maintenance phase was using either bigger concentrations or similar to used for the induction. Also the morphological develop of callus was described. When the 2,4-D was strong lowered for maintenance of callus or initial callus was not subcultured during experiment, were reached the higher SE formation percentage and the number of SE per explant. Callus cultures in liquid medium allowed to reach a morphological develop of SE with high frequency. These SE stilled joined by basal or radicle region to a central tissue with a high embryogenic competence, which was called «matrix», forming a structure alike to a «star». The higher somatic embryos densities per milliliters (233 y 226 ES.ml⁻¹) were achieved with the: I and II fractions, respectively. Also in these fractions was harvested the more quantity of mature somatic embryos. On the other hand was determined that the somatic embryos have more than 95% of viability in all develop stages, while the «matrix» tissue was not alive for any sampled case. The mature somatic embryos were harvested and germinated successfully in solidified MS medium without growth regulators.

Key words: auxin, callus induction, callus maintenance, guava, liquid medium, somatic embryogenesis

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CALLOS DE *COFFEA CANEPHORA* P. VAR. ROBUSTA

María Esther González^{1*}, María Margarita Hernández¹, Luis Miguel Mazorra¹, Yohana Rodríguez², Mireya Cabrera². * Autor para correspondencia.

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). San José de Las Lajas, Gaveta Postal 1. CP 32 700. La Habana, Cuba. e-mail: esther@inca.edu.cu

²Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC). Tercer Frente. Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

Diversos son los factores que influyen en el comportamiento diferenciado de las plantas ante la aplicación de las diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, es por ello que la respuesta inicial del cultivo y su capacidad embriogénica van a depender del genotipo, el estado fisiológico de la planta y el explante, la edad de la planta

donante, los factores físicos, los reguladores del crecimiento y las condiciones nutricionales, así como el cambio estacional. De aquí que el presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de la época del año en que fue tomada la fuente de los explantes en la respuesta *in vitro* de genotipos de Robusta. Se realizaron muestreos durante todos los meses del año, los explantes foliares fueron cultivados en un medio con las sales minerales de Murashige y Skoog y 0.5 y 2.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y kinetina, respectivamente. Se observó que la época del año en que se tomó la muestra ejerció un marcado efecto en la respuesta de los explantes de los genotipos evaluados. Para las condiciones estudiadas resultó favorable la toma de las muestras foliares en los períodos mayo - junio, enero - febrero y noviembre- diciembre, dado los bajos índices de actividad enzimática peroxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica, así como un elevado porcentaje de formación de callos y mayor contenido de proteínas totales presentes en los mismos. Durante la etapa inicial de selección de las muestras se determinó que la actividad enzimática peroxidasa pudiera constituir un importante marcador, siendo este aspecto de gran utilidad práctica en el cultivo *in vitro* del café.

Palabras clave: actividad peroxidasa, callos, contaminación, época del año, oxidación

COFFEA CANEPHORA P. VAR. ROBUSTA CALLUS IN VITRO ESTABLISHMENT

ABSTRACT

The factors that influence in the differentiated behavior of the plants during the application of the different techniques of *in vitro* culture are diverse. that is why the initial response of the tissue and their embryogenic capacity will depend on the genotype, the physiologic state of the plant and the explant, the age of the donating plant, the physical factors, the growth regulators and the nutritional conditions, as well as the seasonal change. The present study was carried out with the objective of evaluating the influence of the season of the year in which the source of the explants was collected in the *in vitro* response of genotypes of Robusta. The samplings were carried out during every month of the year, the leaves explants were cultivated in a culture media with the mineral salts of Murashige and Skoog and 0.5 and 2.0 mg.l⁻¹ of 2,4-D and kinetina, respectively. The season of the year in which the sample were collected had a marked effect in the response of the explants of the evaluated genotypes according to some observations. The collecting of samples in the periods May - June, January - February and November - December were favorable for the studied conditions, due the low enzymatic peroxidases activity , phenolic oxidation and fungus contamination, as well as a high percentage of callus formation and bigger content presence of total proteins in the same ones. During the initial stage, selection of the leaves samples, it was determined that the enzymatic peroxidases activity could constitute an important marker, taking into account the great practical utility of this aspect in the *in vitro* culture of coffee.

Key words: callus, contamination, oxidation, peroxidases activity, time of the year

ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE LA SWIETENIA MACROPHYLLA KING

Raúl Collado*, Raúl Barbón, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez-Terry, Martha Pérez, Odalys Gutiérrez. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. CP 54 830. Cuba. e-mail: raulc@ibp.co.cu

RESUMEN

La aplicación de técnicas de cultivo de tejidos en plantas leñosas, ofrece una alternativa valiosa para la propagación de árboles elite. La caoba (*Swietenia macrophylla* King) es difícil de propagar mediante el cultivo de tejidos. No se cuenta con un sistema de regeneración de plantas vía organogénesis repetible para esta especie, debido básicamente a problemas de contaminación microbiana, oxidación fenólica y muerte de los tejidos en la fase de establecimiento de los explantes *in vitro*. Con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King), se partió de brotes jóvenes tomados de plantas en condiciones de campo. En la desinfección del material vegetal fueron estudiadas dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) combinadas con tres tiempos de exposición. Se cuantificaron el número de explantes contaminados, explantes necrosados y la supervivencia. Para lograr la brotación de los segmentos nodales y ápices *in vitro* se estudiaron cinco concentraciones de 6-BAP (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1.0 mg.l⁻¹) y un control sin reguladores del crecimiento. A los 28 días de cultivo se evaluaron el número de explantes brotados y la longitud promedio del brote (cm). El tratamiento con NaClO al 3.0 % durante 20 minutos mostró el valor máximo de supervivencia y presentó bajos porcentajes de explantes contaminados y necrosados. El número de explantes brotados manifestó un aumento significativo de los valores en el tratamiento donde se adicionaron al

medio de cultivo 0.2 mg.l⁻¹ de 6-BAP. La longitud de los brotes mostraron un incremento en los valores según disminuyó o se eliminó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo. Se logró el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de caoba vía organogénesis a partir de plantas seleccionadas en campo con el empleo de un medio de cultivo MS con los nitratos reducidos a la mitad, 0.2 mg.l⁻¹ de 6-BAP, paso inicial de una propagación directa.

Palabras clave: caoba, desinfección, forestales, micropropagación, segmento nodal

ABSTRACT

The application of tissue culture techniques in ligneous plants offers a valuable alternative for the propagation of elite trees. *Swietenia macrophylla* King is difficult to propagate by means of tissue culture and there is not a system via replicate organogenesis, due, basically, to problems of microbial contamination, phenolic oxidation and death of tissues in the phase of *in vitro* establishment of the explants. Aimed to obtain the *in vitro* establishment of mahogany (*Swietenia macrophylla* King), young buds taken from plants in field conditions were used as starting material. Two concentrations of hypochlorite of sodium (NaClO) combined with three times of exposition were studied for disinfection of plant material. The number of contaminated explants, necrotic explants and survival, were quantified. Five concentrations of 6-BAP (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1.0 mg.l⁻¹) were studied in order to obtain sprouting of nodal segments and apices. After 28 days the number of explants sprouted and average length of the buds (cm) were evaluated. Treatment with 3.0% concentration NaClO during 20 minutes showed maximum value of survival and presented low percentage of contaminated and necrosed explants. Number explants sprouted presented increased significant values when culture medium 0.2 mg.l⁻¹ of 6-BAP was added. The length of the buds showed an increase in the values according to diminish or elimination of the concentration of 6-BAP in culture medium. The establishment of vigorous shoots of mahogany was obtained with a concentration of 0.2 mg.l⁻¹ 6-BAP using nodal segments as explants, initial step of a direct propagation.

Key words: disinfection, explants, forest, micropropagation, nodal segments

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS SOBRE EL DESARROLLO Y ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS ARBÓREAS DEL GÉNERO *PAULOWNIA* SPP. EN ZONAS ÁRIDAS Y SEMI-ÁRIDAS

Lilia Alcaraz Meléndez^{1*}, Sergio Real Cosío¹, Gloria Ayala Astorga², José Manuel Llano Sotelo², Jesús Meza Valenzuela², Maximina Suárez Hernández¹. * Autor para correspondencia.

¹Programa Agricultura de Zonas Áridas, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, México. e-mail: lalcaraz04@cibnor.mx

²Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Paulownia es un árbol de rápido crecimiento, comparado con otros maderables, es fuerte y resistente; se emplea para la obtención de madera, la cual es ligera y resistente, gracias a estas cualidades en muchos lugares se le conoce como el aluminio de las maderas, además de ser resistente, es inalterable, rígida, indeformable, inastillable, no se pudre, impermeable, sin olor, aislante térmico, aislante acústico, fácil de trabajar, teñible y además económica. Debido a la necesidad en las zonas áridas y semi-áridas de resolver los problemas de producción forestal, se espera solucionar un problema prioritario para la región desarrollando biotecnologías para el aprovechamiento de una especie de interés forestal, promoviendo sistemas de producción de cultivos alternativos. El presente trabajo está enfocado hacia la propagación mediante cultivo de tejidos de cuatro especies de *Paulownia*, que son *P. elongata*, *P. fortunei*, *P. imperialis* y *P. catalpifolia*. Se emplearon técnicas *in vitro* para la regeneración siguiendo las estrategias de brotación, proliferación de yemas y organogénesis empleando el medio Wood Plant Wood combinado con 6-bencilaminopurina. Posteriormente se llevaron a cabo estudios fisiológicos con respecto a tolerancia, a salinidad por medio de aplicación de cloruro de sodio, tolerancia a sequía y respuesta morfológica y bioquímica. Los resultados obtenidos mostraron que cada especie tiene diferente grado de tolerancia a salinidad y sequía y se observó que tienen una gran capacidad de adaptación por lo que con los estudios realizados se puede considerar como una especie de interés forestal para promover sistemas de producción de cultivos alternativos en las zonas áridas y semiáridas.

Palabras clave: cultivo de tejidos, *Paulownia*, salinidad, sequía

PHYSIOLOGICAL STUDIES FOR ADAPTATION AND DEVELOPMENT OF *PAULOWNIA* SPP. IN ARID AND SEMI-ARID REGIONS

ABSTRACT

Paulownia is fast-growing, compared to other forest trees. The wood is strong, resistant, light, and used for high value furniture. Because of these qualities, *Paulownia* is known as the aluminum of woods. Additionally, it is rigid, shatterproof, rot resistant, water proof, without scent, easily worked, easy to dye, relatively inexpensive and has low thermal and sound transmission properties. In arid and semi-arid regions, there is a pressing need to solve forest production. This investigation attempts to solve forestry environmental and economic problems by developing biotechnological strategies for improving forest production by promoting systems of alternative production. In particular, we focused on propagation by tissue culture of four species of *Paulownia* (*P. elongata*, *P. fortunei*, *P. imperialis*, and *P. catalpifolia*). *In vitro* techniques for regeneration followed bud production and proliferation strategies were used. Organogenesis required wood plant medium combined with 6-benzilaminopurine. Physiological studies of salt tolerance were tested with application of sodium chloride. Drought tolerance and morphological, and biochemical analyses were performed. Our results showed that the several species have different degrees of tolerance for salt and drought and all species had great capacity of adaptation to stress conditions. Therefore, *Paulownia* should be considered as a plantation tree that will grow quickly under semi-arid conditions. Agencies should promote production systems involving *Paulownia* as an alternative silviculture in arid and semi-arid ecosystems.

Key words: drought, *Paulownia*, salinity, tissues culture

EVALUACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN ELECTROMAGNÉTICA EN LA MULTIPLICACIÓN DE *COFFEA ARABICA* POR CULTIVO *IN VITRO*

Elizabeth Isaac Aleman!¹, Yalina Perez Portero^{2*}, Anmarli O. Rodríguez. * Autor para correspondencia.

¹Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado.

²Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Patricio Lumumba S/N CP. 90 500.
e-mail: yalyfpp@gmail.com, yalyfpp@yahoo.es, yalinapn@cnt.uo.edu.cu

RESUMEN

Resultados de varias investigaciones confirman la existencia de una relación significativa entre el campo electromagnético y una amplia variedad de procesos biológicos a escala celular, actualmente se realizan numerosas investigaciones sobre la estimulación electromagnética en la agricultura. Con el objetivo, de determinar los tiempos de exposición y niveles de inducción electromagnética que mayor efecto estimulador producen en la multiplicación de plántulas de *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15 (café) por cultivo *in vitro* y de medir algunos parámetros morfométricos de las plántulas estimuladas se realizó este trabajo, en el cual se empleó la Metodología de Micropropagación e Identificación Bioquímica de variedades de café (*Coffea* sp.) y se utilizó el dispositivo electromagnético BioNak-03. Se realizaron tratamientos crónicos variando el nivel de inducción electromagnética a 20, 40 y 60 Gauss además del tiempo de exposición a 3 y 9 minutos en la fase de multiplicación. Se determinó la mejor inducción y el mejor tiempo de exposición, los parámetros morfométricos evaluados (la longitud del tallo y la raíz, número de pares de hoja; área foliar) se tomaron como medidas para determinar la mejor inducción y el mejor tiempo de exposición. Los resultados demuestran que este tratamiento electromagnético es adecuado para acelerar la multiplicación de plántulas *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15, aumentando por tanto el número de plántulas en el tiempo y el desarrollo de las mismas.

Palabras clave: café, inducción, multiplicación

ABSTRACT

Result of several researches confirms the existence of a significant relationship between the electromagnetic field and a wide variety of biological processes to cellular scale. At the moment they are carried out numerous investigations on the electromagnetic stimulation in the agriculture. With the objective of determining the times of exhibition and levels of electromagnetic induction that bigger stimulant effect takes place in the plants multiplication of *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15 (coffee) for *in vitro* culture and for measuring some morphological parameters of the stimulated plants it was carried out this work, in which was used the Methodology of Micropropagation and Biochemical Identification of coffee varieties (*Coffea* sp.) and was used the electromagnetic device BioNak-03. They were carried out chronic treatments varying the level of electromagnetic induction to 20, 40 and 60 Gauss besides the time of exhibition to 3 and 9 minutes in the

multiplication stage. It was determined the best induction and the best time of exhibition, the morphological parameters evaluated (the stem and root longitude, number of leaves and the area of foliate surface) they took as measures to determine the best induction and the best time of exhibition. The results demonstrate that this electromagnetic treatment is adapted to accelerate the plants multiplication of *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15, increasing the plants number therefore in the time and the development of the same ones.

Key words: coffea, multiplication, stimulation

FORMACIÓN DE CALLOS EN LA ESPECIE *PINUS CUBENSIS* GRISEB

Raima Cantillo Ardebol*, Luis Rodríguez de Francisco, Omar Guadalupe Alvarado, Camila Rosales, Janet Igarza, Argelio Pifferrer, Ana M. Ochoa. * Autor para correspondencia.

*Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT), Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Gaveta Postal # 41. CP 80 100. e-mail: rayma@cbv.holguin.inf.cu

RESUMEN

La Meseta Pinares de Mayarí es el hábitat de la especie *Pinus cubensis* Griseb., endémica de la región, amenazada por minería y explotación maderera. Comenzando los sesenta se desarrolló una técnica para la reproducción de plantas por cultivo de tejidos, que se fue modificando para numerosas especies. Una de las técnicas de micropropagación más comunes, y la más recurridas para iniciar trabajos con alguna nueva especie, es la formación de brotes axilares seguido del enraizamiento de los mismos. Además es la que presenta mayores garantías de estabilidad genética. Teniendo en cuenta lo ya analizado se presenta el problema de que no existe una metodología para la micropropagación de *Pinus cubensis* capaz de satisfacer la demanda de semillas en el país para planes de reforestación en áreas minadas y de explotación forestal. Por este motivo se establece como objetivo para el presente trabajo: Lograr la formación de callos en *Pinus cubensis* para iniciar trabajos sobre embriogénesis somática. Como explante inicial se utilizaron plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de embriones escindidos de semillas de *Pinus cubensis*. Como medio de cultivo basal se empleó el planteado por Murashige y Skoog, 30g.l⁻¹ de sacarosa y 7g.l⁻¹ Agar. Se probaron cuatro combinaciones de diferentes tipos de reguladores del crecimiento para seis tipos de explantes, para un total de 24 tratamientos. Todos los tratamientos produjeron callos, siendo los mejores Kin (18 ì M) + ANA (5.4 ì M) y 2ip (18 ì M) + ANA (5.4 ì M), independientemente del tipo de explante, con porcentajes de formación de 86.2 y 85% respectivamente. De esta forma se logra por primera vez la formación de callos para esta especie.

Palabras clave: forestales, formación de callos, micropropagación

CALLUS FORMATION IN *PINUS CUBENSIS* GRISEB. SP.

ABSTRACT

The Plain of Pinares de Mayarí is the habitat of *Pinus cubensis* Griseb. specie, endemic from the region, threatened by mining and wood industry. In the beginning of 60's a tissue culture technique for plant reproduction was developed. It was modified for several species. One of the micropropagation techniques most common, and most used to initiate works with new species, is the axillary shoots formation with rooting. Not existing a methodology to *Pinus cubensis* micropropagation, that satisfy the needs of seeds for reforestation in mining and wood exploitation areas, the following goal is set: To achieve *Pinus cubensis* callus formation to initiate somatic embryogenesis procedures. As inicial explant it was used *in vitro* plant obtained from excised embryos germinated *in vitro*. Basal medium was MS, supported with sucrose 30 g.l⁻¹ and Agar 7g.l⁻¹. Four combinations of different kinds of plants growth regulators for six types of explants are tested, to 24 total treatments. Callus were produced by all treatments, being the best Kin (18 ìM) + ANA (5.4 ìM) and 2ip (18 ìM) + ANA (5.4 ìM) combinations, independently of explant type, with 6.2 y 8.5 formation averages respectively. Thus, for first time callus from *Pinus cubensis* are successfully obtained.

Key words: callus formation, forest, micropropagation

GERMINACIÓN *IN VITRO* DE *PINUS CUBENSIS* GRISEB

Raima Cantillo Ardebol*, Luis Rodríguez de Francisco, Omar Guadalupe Alvarado, Camila Rosales, Janet Igarza, Argelio Pifferrer, Ana M. Ochoa. *Autor para correspondencia.

*Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT), Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Gaveta Postal # 41. CP 80 100. e-mail: rayma@cbv.holguin.inf.cu

RESUMEN

La Meseta Pinares de Mayarí es el hábitat de la especie *Pinus cubensis* Griseb., endémica de la región, amenazada por minería y explotación maderera. Comenzando los sesenta se desarrolló una técnica para la reproducción de plantas por cultivos de tejidos, que se fue modificando para numerosas especies. Una de las técnicas de micropropagación más comunes, y la más recurridas para iniciar trabajos con alguna nueva especie, es la formación de brotes axilares seguido del enraizamiento de los mismos. Además es la que presenta mayores garantías de estabilidad genética. Teniendo en cuenta lo ya analizado se presenta el problema de que no existe una metodología para la micropropagación de *Pinus cubensis* capaz de satisfacer la demanda de semillas en el país para planes de reforestación en áreas minadas y de explotación forestal. Por este motivo se establece como objetivo para el presente trabajo: Lograr la germinación *in vitro* de la especie *Pinus cubensis*. Para ello se utilizaron semillas, sometidas a un pre-tratamiento de inmersión en agua durante 72, luego se desinfectaron lavándolas con detergente comercial más unas gotas de Tween 20 en agitación constante durante 20 minutos y aplicándoles Cloralex (cloro comercial al 6%) a diferentes concentraciones y tiempos. Como medio basal se empleó el Murashige y Skoog. Se evaluó la germinación de semillas en medio de cultivo con diferentes reguladores del crecimiento y se determinó la influencia de la presencia o ausencia de la cubierta de la semilla en el proceso, implantando semillas con y sin testa en el mejor medio obtenido en el experimento anterior. Los mejores resultados se lograron desinfectando el material vegetal con Cloralex al 15% en 15 minutos de inmersión e implantando semillas sin testa en medio de cultivo MS libre de reguladores del crecimiento. Con este método se logró la germinación de la especie.

Palabras clave: forestales, germinación, micropropagación

IN VITRO GERMINATION OF *PINUS CUBENSIS* GRISEB

ABSTRACT

The Plain of Pinares de Mayarí is the habitat of *Pinus cubensis* Griseb. specie, endemic from the region, threatened by mining and wood industry. In the beginning of 60's a tissue culture technique for plant reproduction was developed. It was modified for several species. One of the micropropagation techniques most common, and most used to initiate works with new species, is the axillary shoots formation with rooting. Not existing a methodology to *Pinus cubensis* micropropagation, that satisfy the needs of seeds for reforestation in mining and wood exploitation areas, the following goal is set: To achieve *in vitro* germination from *Pinus cubensis*. As initial explant it was used seeds previously pre-treated with 72 h water immersion. Disinfected started with a wash with commercial detergent plus three drops of Tween 20 in permanent agitation during 20 minutes. Then, Cloralex (commercial bleach at 6%) at different concentrations and time were tested. As basal medium Murashige y Skoog was used. Germinations of seeds in medias with different plant growth regulators were evaluated, and the influence on germination of the presence or absence of seminal cover was determined, planting seeds with or without seminal cover in best media obtained in former experiment. Best results were achieved disinfecting material with Cloralex at 15% in 15 minutes of immersion then planting seeds without seminal cover in MS media free of plant growth regulators. Thus, germination of the specie was achieved for first time.

Key words: forest, germination, micropropagation

HISTOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN DE BROTES ADVENTICIOS EN HOJAS DE *PSIDIUM GUAJAVA* L. VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18-40, CULTIVADAS *IN VITRO*

Lelurlys Nápoles Borrero¹, Oscar Concepción Laffitte¹, Pedro Marrero Suárez³, Ninel Peralta Ballbé², Aurora T. Pérez Martínez², Reinaldo Trujillo Sánchez². * Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos; ²Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón, km 9. CP 69 450. Ciego de Avila. Cuba. e-mail: lnapoles@bioplantas.cu

³Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón, km 9. CP 69 450. Ciego de Avila. Cuba.

RESUMEN

Se realizó un estudio histológico del proceso de regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro* con el objetivo de determinar el mecanismo morfogénico que da lugar a los brotes regenerados, así como demostrar el papel de la herida en este proceso. Luego de un período de cultivo *in vitro*, las hojas de los brotes apicales se separaron por el peciolo, se le realizaron varios pinchazos a lo largo del nervio central y se colocaron con polaridad axial en frascos de cultivo que contenían 25 ml de medio de cultivo de regeneración de brotes MS 0.75 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.1 mg.l⁻¹ de AIA. Estos explantes se muestrearon con una frecuencia de 11 días hasta hacer los 44 días de cultivo. Las muestras fueron procesadas y teñidas con la técnica de doble tinción Safranina-Fast Green. Se pudo observar que las denominadas protuberancias o pequeños nódulos meristemáticos tienen un origen pluri-tisular. Se evidenció que en algunos casos la proliferación de pequeños grupos de células meristemáticas se inició a partir del tejido epidérmico y sub-epidérmico, mientras que en otros el tejido parenquimático perivasculoso comenzó a desarrollar una serie de divisiones anticlinales y periclinales que dieron lugar a deformaciones en el nervio central hasta formar estructuras nodulares. Se demostró que en las hojas de guayaba la principal actividad morfogénica ocurre en los tejidos que conforman el nervio central y está asociada fundamentalmente a las zonas donde se produjo una herida. Por otro lado se comprobó que las protuberancias son estructuras nodulares organizadas en centros meristemáticos que alcanzan en ocasiones un estado de diferenciación que le permite independencia y con ello la organización de un meristemo caulinar el cual da lugar a un brote. Con estos resultados se pudo verificar que los brotes originados a partir de las hojas de guayaba cultivadas *in vitro* tienen un origen organogénico indirecto.

Palabras clave: cultivo de tejidos, guayaba, histología, organogénesis, regeneración de brotes

HISTOLOGY OF ADVENTITIOUS SHOOT REGENERATION FROM *IN VITRO* CULTURED LEAVES OF GUAVA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18-40

ABSTRACT

A histological study was performed for adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of guava (*Psidium guajava* L.) in order to determine the morphogenetic mechanism that allows the shoot regeneration and to show the role of wound in this process. After an adequate *in vitro* culture period the leaves were removed from apical shoot and were wounded at the main vein. The leaves were inoculated in 25 ml of regeneration medium MS supplemented with 6-BAP 0.75 mg.l⁻¹ and AIA 0.1 mg.l⁻¹. The explants were sampling with a frequency of 11 day during 44 days of culture. The samples were processed and tinted with Safranin-Fast Green. In different slides was observed that the protuberances or little meristematic nodules formed have a pluri-tissular origin. In several cases meristematic cellular divisions were beginning from epidermal and sub-epidermal tissues, while in other cases the vascular parenchymatic tissues began to develop with continued anticlinal and periclinal cell divisions until forming the nodular structures. Also, was demonstrated that the most important morphogenic ability of guava leaf was carry out at the main vein and it was generally associated with the wounded region. On the other hand was confirmed that the protuberances are nodular structures organized in meristematic centres which achieve a high differentiation stage that allows independence and the reorganization of a new caulinar meristem. With these results was possible verify that the adventitious regenerated shoots from *in vitro* cultured leaves of guava have an indirect organogenic origin.

Key words: guava, histology, organogenesis, shoot regeneration, tissues culture