

Aplicación de biotécnicas al cultivo de plantas de interés comercial.

TERESA E. VARGAS¹, ALEJANDRA BETANCOURT¹, MELVIN MAIQUETIA¹, LUIS HERMOSO²,
ANDREA MENENDEZ², MARCIA TORO³ Y EVA DE GARCIA¹.

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, ²Laboratorio de Clonación y Genética Vegetal,
Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental.

³Laboratorio de Estudios Ambientales, Instituto de Zoología y Ecología Tropical.
Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela Apartado 47114. Caracas 1041A,
Venezuela. Correo-e: teoriedu@cantv.net

Helianthus annuus L., *Stevia rebaudiana* B, *Cassia moschata* son tres especies vegetales que han podido agregarse al Banco de Germoplasma *in vitro* que funciona en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE). Esto ha sido posible con el empleo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Estas especies se sumaran al grupo de especies ornamentales, medicinales, industriales y hortícolas, ya existentes desde hace décadas y que se han mantenido a lo largo del tiempo, con repiques sucesivos del material vegetal a medios de cultivo fresco cada 2 meses, con el fin de tener material vegetal en condiciones de asepsia para futuras investigaciones o producción masiva. Así mismo, muchas plantas en simbiosis con bacterias y hongos, fijan nitrógeno atmosférico, como es el caso de *Rizobium* y los hongos *Glomeromycota* formando micorrizas arbusculares que permiten una mejor nutrición fosforada, favoreciendo a su sobrevivencia en vivero, por lo cual se esta comenzando a emplear esta técnica en el laboratorio de Biotecnología Vegetal para mejorar la aclimatización de algunas especies micropropagadas.

Introducción

Cada año se incorporan mas especies vegetales de interés comercial al Banco de Germoplasma *in vitro* que funciona en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias de la UCV, producto de las investigaciones dirigidas a dar solución de algunos problemas específicos en la agricultura del país. Estas investigaciones se basan en el Cultivo de Tejidos Vegetales, lo cual abarca un grupo de técnicas que consisten en el cultivo *in vitro* en condiciones asépticas de células, tejido u órganos vegetales (11).

Micropropagación de *Stevia rebaudiana* B a partir de microesquejes.

En Venezuela al igual que en muchos países del mundo en los últimos años se viene haciendo uso de las plantas de *Stevia* en la fabricación de edulcorante. Las hojas de esta planta contienen glucósidos de sabor mucho más dulces que la sacarosa, pero que no son metabolizables y tampoco contienen calorías (7,8). El objetivo de esta investigación fue la micropropagación masiva de esta especie; para ello se

cultivaron microesquejes, de plantas obtenidas en vivero, de 1 cm de longitud, en el medio Murashige y Skoog (1962) (6): sin hormonas (M1), con 0,2 mg/L de benciladenina y 0,001 mg/L de ácido indolacético (M2), y 1 mg/L de benciladenina con 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético (M3) (8) (Fig. A).

A los 15 días de cultivo, el porcentaje de brotación observado fue de 20% en el medio M1, 40% en M2 y 70% en M3; con un promedio de brotes por explante de 0,2 en M1, 1,7 en M2 y 2,3 en M3 (Fig. B y C). El promedio de brotes por explante fue mayor en el medio M3, obteniéndose también una organogénesis indirecta.

Una vez establecido el cultivo *in vitro*, para la etapa de multiplicación se utilizó el medio M3, obteniéndose un promedio de 16,75 brotes por explante (Fig. D). En la etapa de enraizamiento se apreció un promedio de 10,2 (M1), 3,2 (M2) y 2,1 (M3) raíces/planta. En la etapa de aclimatización se empleó con éxito una mezcla arena y tierra abonada estéril 1/1. Con la metodología empleada se logró un alto porcentaje de plantas aclimatadas a condiciones de vivero (Fig. E).

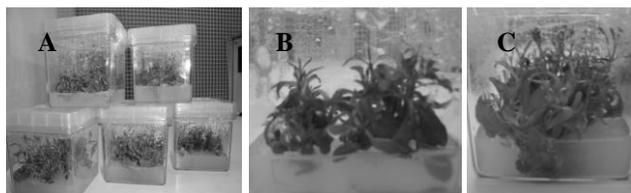


Figura. A. Cultivo inicial de *Stevia rebaudiana*, a partir de microesquejes, en los medios M1, M2 y M3. **B y C.** Detalle de los brotes formados, a los 15 días de cultivo, en M1 y M2 respectivamente.



Figura. D. Etapa de multiplicación de *Stevia rebaudiana*, en el tratamiento M3, donde se observa un número promedio de brotes por explante de 16,75.



Figura. E. Planta aclimatada de *Stevia rebaudiana* en una mezcla de arena y tierra abonada estéril 1/1.

Propagación in vitro de plantas de Helianthus annuus L. vía organogénesis y embriogénesis somática, a partir de microesquejes y cotiledones.

Helianthus annuus L. (Girasol) es una planta importante en el comercio mundial por la producción de aceite comestible, por ser una ornamental exuberante, alimento para ganado, aves y algunas veces por el consumo humano.

Una vez obtenida la germinación *in vitro* de semillas comerciales de girasol (Figura F), se aislaron microesquejes y segmentos longitudinales de cotiledones, para ser cultivados en medios que contenían las sales Murashige y Skoog (1962) (6), suplementado con 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/L mio-inositol, 10 mg/L de vitaminas de Morel, 30 g/L de sacarosa, ajustados a un pH de 5,8 y solidificados con 8 g/L de agar. Para la multiplicación de brotes e

inducción de la organogénesis los medios contenían: 1 mg/L ácido naftalenoacético con 2 mg/L benciladenina (medio 1) y 2mg/L de benciladenina (medio 2) (9), y para la inducción de la embriogénesis somática el medio fue suplementado con 1 mg/l de ácido 2,4 diclorofenoacético (1). En el proceso de multiplicación, a las cuatro semanas de cultivo, se observó la formación de brotes y la inducción de callo organogénico en la base de todos los microesquejes sembrados (Figura G). En el medio 1 el porcentaje de explantes con brotes y callo fue del 75% y el número promedio de brotes por explante fue de 2,7. En el medio 2 el porcentaje de explantes que respondieron hacia la formación de brotes y callo fue de 70% y el promedio de brotes por explantes fue de 2,52. Se realizaron cortes anatómicos, comprobándose la naturaleza de organogénesis indirecta del proceso (Figura H).

Por otra parte se observó la formación de embriones somáticos en estado globular en el 70% de los cotiledones sembrados, a las siete semanas de cultivo, y con un promedio de 29 embriones/explante (Figura I). Estudios histológicos permitieron demostrar que la embriogénesis somática, ocurrió de manera directa, sin la formación de callo (Figura J). Para las subsiguientes etapas de desarrollo, después de 11 semanas, los embriones globulares fueron aislados y trasladados, individualmente y en grupos, a dos medios: MS1 (1 mg/l de ácido indolacético y 2 mg/l de cinetina) y MS2 (0,5 mg/l de ácido naftalenoacético y 1 mg/l de benciladenina). En los medios probados no se observaron las subsecuentes etapas de desarrollo de los embriones somáticos globulares, pero se observó, a simple vista y usando técnicas histológicas, la formación abundante de dos tipos de callos, en la superficie de los embriones cultivados en grupos, un callo embriogénico que dio origen a más células embriogénicas, y otro organogénico del cual se regeneraron brotes (Figura K).



Figura F. Plantas de *H. annuus L.* germinadas *in vitro*, a partir de semillas

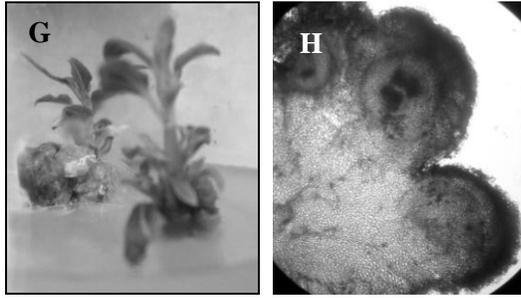


Figura G. Respuesta de los microesquejes en medio 1, con desarrollo de algunos brotes y callo en la base. **H.** Corte anatómico del callo con formación de tres brotes y su conexión vascular.

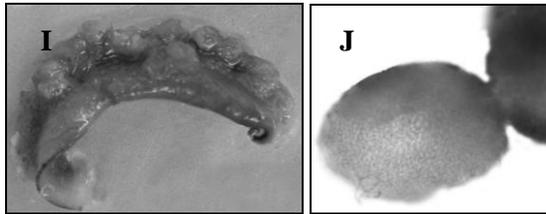


Figura I. Formación de embriones somáticos de *H. annuus* L. en los segmentos de cotiledones cultivados en 2,4D; a las siete semanas de cultivo. **J.** Corte longitudinal del embrión globular, mostrando la ausencia de conexión vascular con el tejido de origen (cotiledón).

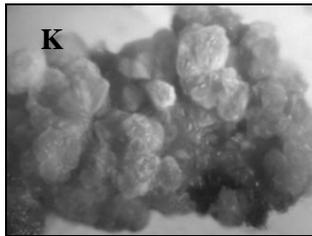


Figura K. Formación del callo organogénico sobre la superficie de los embriones cultivados en MS2, con detalle de los brotes formados a los tres meses de cultivo.

Propagación in vitro de una especie forrajera Leguminoseae: Cassia moschata (Cañafistula)

La familia Leguminoseae-Fabaceae comprende de aproximadamente 750 géneros, y está constituida por tres subfamilias, Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae (10).

Las plantas de *Cassia moschata* Kunth (Leguminoseae – Caesalpinioideae) tienen forma de vida arbustiva en su estado adulto, predominando en las selvas de galerías, y se encuentran en las riberas de los ríos de los llanos Venezolanos. Especie de interés ecológico, debido a su utilización como barrera viva en sistemas agrícolas sustentables ya que sus frutos suplen la escasez de gramíneas durante la estación de sequía significando una fuente de

alimento para la mega fauna silvestre de la Amazonía (4). Además de inducir cambios en el suelo debido al suministro de nitrógeno, en aquellos que tienen baja fertilidad; fijan nitrógeno atmosférico a través de la asociación con bacterias de los géneros *Rizobium* y los hongos *Glomeromycota* formando micorrizas arbusculares que permiten una mejor nutrición fosforada. En condiciones naturales esta especie dura 180 días en germinar (2).

El objetivo de esta investigación fue obtener plantas *in vitro* desde semillas de *Cassia moschata* Kunth para establecer un banco de germoplasma y disponer de ellas durante cualquier época del año. Los frutos fueron colectados de árboles que crecen naturalmente en las sabanas neotropicales (Llanos Centrales de Venezuela, incluyendo Edo. Guárico). Una vez aisladas las semillas, se procedió a desinfectarlas y escarificarlas, posteriormente, se colocaron en medio basal de Murashige y Skoog (1962) (6), bajo condiciones de luz continua y temperatura de 23 ± 1 °C (5). A los 5 y 21 días de tratamiento se encontró un 20 y 85 % de semillas germinadas de *C. moschata*, respectivamente (Figura L y M). En este medio sin hormonas se formaron callos en la base de las plántulas (Figura N). Consecutivamente se observó un incremento significativo en el crecimiento de la raíz principal ya desarrollada y ramificación de raíces finas laterales. A los 3 meses de cultivo en medio MS las plántulas alcanzaron una altura de 6 a 8 cm, con abundantes hojas; estas se llevaron a la etapa de aclimatización, donde fueron sometidas a inoculación con *Rhizobium* y hongos *Glomeromycota* (2 mL y 20 g respectivamente), al mismo tiempo (Figura O). A los 120 días de tratamiento se observó un incremento significativo en todos los parámetros morfológicos, con respecto a aquellas plantas sin inoculación, lo que sugiere una respuesta sinérgica de ambos microorganismos favoreciendo a su sobrevivencia con respecto al control (Figura P y Q).



Figura. L. Etapa de germinación a los 5 días de tratamiento. **M.** y 21 días, con formación de raíces.

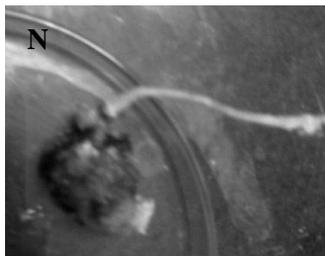


Figura N. Estructura del callo de la raíz a los 21 días de tratamiento.



Figura O. Etapa de inoculación con los Rizobium y HMA.



Figura P. *Cassia moschata* inoculada y en etapa de aclimatización y **Q.** sin inocular (Control).

Agradecimientos.

Estas investigaciones han sido financiadas por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH).

Referencias:

1. **Betancourt, A., Vargas, T. y de García, E.** (2013). Embriogénesis somática en *Helianthus annuus* L. a partir de segmentos de cotiledones. LXIII Convención Anual de ASOVAC. 2013, Carabobo.
2. **Buch, M., Jara, L. y Franco, E.** (1997). Viabilidad de semillas pretratadas de *Caesalpinia velutina* Standl; *Enterolobium cyclocarpum* (j) y *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. **Boletín Mejoramiento Genético y Semillas Forestales** **16:** 8-19.
3. **Flores, O., Bolívar, D.M., Botero, J. e Ibrahim, M.** (1998). Parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas con potencial forrajera para la suplementación de rumiantes en el trópico. **Livestock Research for Rural Development** **10(1)**.
4. **Fragoso, J.M. y Huffman, J.M.** (2000). Seed dispersal and seedling recruitment patterns by the last Neotropical megafaunal element in Amazonia, the tapir. **Journal of Tropical Ecology** **16:** 369-385.
5. **Maiquetía, M., Vargas, E., Toro, M. y García, E.** (2011). Germinación *in vitro* y *ex vitro* de dos especies de Leguminosae forrajeras en Venezuela. Memorias III Encuentro Nacional de Biotecnológica Agrícola REDBIO 2011, Maracay.
6. **Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** **15:** 473-479.
7. **Oriza, C., Zarate, S., Buendía, L., Orozco, J. y Lechuga, A.** (2001). Establecimiento de cultivos de callo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. a partir de explantes foliares. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. No. 186.
8. **Suárez, I. y Salgado, J.** (2008). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. **Revista Temas Agrarios** **13:** 40-48.
9. **Sujatha, M., Vijay, S., Vasavi, S., Svaraj, N. y Rao, C.** (2012). Combination of thidiazuron and 2-isopentenyladenine promotes highly efficient adventitious shoot regeneration from cotyledons of mature sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** **111:** 359-372.
10. **Trinick, M. y Galbraith, J.** (1976). Structure or root nodules formed by Rhizobium on the non legume. *Trema cannabina* var scabra. **Arch. Microbiol.** **108:** 159-166.
11. **Villalobos, V. y Thorpe, T.** (1993). Propagación: Conceptos, metodología y resultados. En: **Cultivo de Tejidos en la Agricultura.** Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia: 127-143.