

Propagación in vitro de Quishuar (buddleja incana ruíz&pav)

Jiménez Enriquez, Paola; Barrera Aguilar, Paulo; Huachi Espín, Laura Elizabeth; Vera Zambrano, Antonio;

Caicedo Vargas, Carlos

Propagación in vitro de Quishuar (buddleja incana ruíz&pav)

La Granja. Revista de Ciencias de la Vida, vol. 31, núm. 1, 2020

Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476062548005>

DOI: <https://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.05>

2020.Universidad Politécnica Salesiana

2020.Universidad Politécnica Salesiana



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirlIgual 4.0 Internacional.

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Propagación in vitro de Quishuar (buddleja incana ruíz&pav)

Propagation In Vitro Of Qusihuar (Buddleja incana Ruíz & Pav)

Paola Jiménez Enriquez

Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador

 <http://orcid.org/0000-0001-7026-8537>

Paulo Barrera Aguilar

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ecuador

 <http://orcid.org/000-0003-1465-1114>

Laura Elizabeth Huachi Espín lhuachi@ups.edu.ec

Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador

 <http://orcid.org/0000-0002-8413-3534>

Antonio Vera Zambrano

Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador

 <http://orcid.org/0000-0002-9136-8825>

Carlos Caicedo Vargas

Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador

 <http://orcid.org/0000-0002-2777-5282>

La Granja. Revista de Ciencias de la Vida,
vol. 31, núm. 1, 2020

Universidad Politécnica Salesiana,
Ecuador

Recepción: 08 Mayo 2019

Aprobación: 04 Febrero 2020

Publicación: 01 Marzo 2020

DOI: [https://doi.org/10.17163/
lgr.n31.2020.05](https://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.05)

Redalyc: [https://www.redalyc.org/
articulo.oa?id=476062548005](https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476062548005)

Resumen: Quishuar es una especie forestal apreciada por sus usos. La explotación intensiva y la oferta insatisfecha de plantas han sido limitantes para cumplir con programas de reforestación. La micropropagación es una técnica que ayudaría a erradicar este problema ya que el propósito es producir mayor cantidad de plantas en menor tiempo. El objetivo de esta investigación fue desarrollar protocolos para la desinfección, establecimiento y multiplicación *in vitro*, para el efecto se realizaron ensayos partiendo de semillas y brotes de plantas. La primera fase se realizó con semillas, utilizando kilol y benomil, junto con NaOCl al 3 % (10 min). Los resultados indican que el porcentaje de germinación fue de 100 % en MS (Murashige y Skoog medium) y el porcentaje de contaminación y oxidación de 0 %. Por otro lado, los brotes sometidos a fungicidas con adición de antioxidantes y NaOCl al 1 % (10 min) no presentaron contaminación ni oxidación. El porcentaje de brotación fue de 100 % en WPM (Woody Plant Medium). En la segunda fase en medio MS sin adición de hormonas se observó una mayor longitud de brote (1.95 cm), número de nudos (1.94 nudos) e índice de multiplicación (2.47). Basándose en los resultados, se sugiere que los protocolos son efectivos para la propagación *in vitro*.

Palabras clave: Contaminación, *in vitro*, oxidación, Quishuar..

Abstract: Quishuar is a forest species which is well known for its uses. Intensive farming and unsatisfied plant supply have been limited to meet reforestation programs. Micropropagation is a technique that would help eradicate this problem as the purpose is to produce more plants in less time. The objective of this research was to develop protocols for disinfection, establishment, and multiplication *in vitro*; for this reason, tests from seeds and plants sprouts were carried out; the first phase with seeds, using kilol and benomil, together with NaOCl at 3 % (10 min). The results indicate that the germination percentage was 100 % in MS (Murashige y Skoog medium)

and the contamination, oxidation percentage was 0 %. On the other hand, plants sprouts exposed to fungicides, antioxidants and NaOCl at 1 % (10 min), did not have contamination or oxidation. The sprouting percentage was 100 % in WPM (Woody Plant Medium). In the second phase in MS medium without the addition of hormones, plant sprouts (1.95 cm), knots number (1.94 knots) and multiplication rate (2.67) were observed. Based on the results, it is suggested that protocols are effective for *in vitro* propagation.

Keywords: contamination, *in vitro*, oxidation, Quishuar.

Forma sugerida de citar:

Jiménez, P., Barrera, P., Huachi, L., Vera, A. y Caicedo, C. (2020). Propagación *in vitro* de quishuar (*Buddleja incana Ruiz & Pav*). La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 31(1):71-81. <http://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.05>.

1 Introducción

Ecuador es considerado un país con vocación forestal; sin embargo, este sector aporta poco a la economía de la nación. Existe alrededor de 7 millones de hectáreas de bosques con potencial de manejo forestal y menos del 10 % reúnen condiciones económicas para ser sometidas a un manejo forestal sustentable (Sánchez, 2012).

Los recursos genéticos forestales RGF's, se están perdiendo a una velocidad alarmante debido a un aprovechamiento indiscriminado y a la falta de incentivos para su conservación y uso sostenible. El conocimiento de los RGF's aún es precario e insuficiente, y son escasos los estudios y las instituciones que realizan actividades para su protección, y la disponibilidad actual de información específica sobre la situación, tendencias y recuperación de los RGF's es deficiente (Ministerio del Ambiente-MAE, 2005, pág. 30).

Así Quishuar (*Buddleja incana*) es un árbol de la familia Scrophulariaceae con una altura de aproximadamente 15 m, con flores agrupadas en cabezas y frutos pequeños de 5-6 mm de longitud. Este árbol es una especie forestal nativa de Ecuador y se encuentra en las provincias de Chimborazo, Pichincha, Tungurahua, Azuay, Loja e Imbabura (Grijalva et al., 2012). La madera se utiliza para la elaboración de arados, timones, yugos, cabos de azadón, postes, estacas, artesanías, construcción de viviendas y corrales. Además, se utiliza la infusión de las hojas para fines medicinales como antirreumático, cicatrizante, antibacteriano y antimicótico, y para estimular la proliferación del endometrio y regenerador de la piel, en ratones se ha demostrado que inhibe la ciclooxygenasa (COX₂) (Gómez, 2006).

La propagación a través de los métodos convencionales establecidos para Quishuar presenta varios problemas, la multiplicación en vivero requiere de 5 meses, lo cual se traduce en mayores gastos de producción y menos producción de plantas por año (Gárate, 2010). La cantidad de material vegetativo disponible es insuficiente para la forestación, reforestación en áreas degradadas de los páramos y cuencas

hidrográficas, siendo una de las estrategias para superar las dificultades de propagación convencional el cultivo in vitro de tejidos vegetales (Delgado, Hechenleitner y Thiers, 2008). El cultivo in vitro es una técnica de producción vegetal en condiciones totalmente asépticas, se basa en la “totipotencialidad celular”, esto es, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa bajo ciertas condiciones. Así se logra la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original, a partir de cualquier parte de la planta, ya sea trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas (Reyes y Hewstone, 1994).

Según Vallejo (1988), la propagación de esta especie a nivel de laboratorio presenta algunos problemas como la longitud de brotes 8.6 mm, bajo porcentaje de número de nudos por planta (1.5 nudos) y en lo que se refiere a contaminación no existen datos reportados. Sin embargo, Cárdenas (2011), manifiesta que la contaminación es la principal limitante en el desarrollo in vitro de esta especie forestal, pues la tasa de supervivencia no supera el 54 %, debido principalmente a afecciones por hongos y bacterias.

Debido a las dificultades de la propagación convencional y a los resultados obtenidos en laboratorio por Cárdenas (2011) y Vallejo (1988), se ha propuesto establecer un método para la desinfección, establecimiento y multiplicación de Quishuar mediante la aplicación de técnicas de cultivo in vitro, porque es imprescindible generar estrategias que permitan la propagación y conservación de esta especie.

La investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo para la propagación in vitro de Quishuar (*Buddleja incana*).

2 Metodología

El presente estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Departamento Nacional de Biotecnología en INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias), Sector Cutuglahua, Cantón Mejía, Provincia Pichincha y en comunidades Kichwa de la Sierra.

3 Material vegetal y preparación de explantes

Se emplearon semillas y yemas (axilares y apicales) de plantas de Quishuar de la comunidad Kichwa San Juan, Chimborazo. Previo a la investigación, las plantas fueron trasladadas hasta el invernadero del Departamento Nacional de Biotecnología, fumigadas cada 8 días con una aplicación de Carbendazim 1 ml l⁻¹ y Skul Fe (Thiodicarb) 1 ml l⁻¹ para prevenir la contaminación, las plantas fueron fertilizadas cada 15 días con Stimufol 1g l⁻¹ y el riego se realizó dos veces por semana con 200 ml l⁻¹ de agua potable por planta (LCT-INIAP, 2014).

4 Fases de la propagación *in vitro*

Fase de desinfección y establecimiento. - Las semillas recolectadas fueron colocadas en un recipiente con una solución de agua y detergente, posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todas las impurezas. Una vez lavadas fueron sumergidas en una solución de Povidin (Yodo-povidona) 1 % durante 60 minutos, fueron transferidas a una solución de Benomilo (Benzimidazol) $0,10\text{ g l}^{-1}$ adicionando 30 gotas de Kilol (*Citrus paradisi*). Se llevaron las semillas a cámara de flujo laminar, en donde se realizaron 2 enjuagues con agua destilada e inmediatamente se sumergieron en una solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) 3 % durante 10 minutos, posteriormente se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas fueron sembradas en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog medium) y WPM (Woody Medium Plant), e incubadas a 18°C durante 30 días.

Por otro lado, las yemas (axilares y apicales) fueron igualmente lavadas con una solución de agua con detergente y lavadas con agua corriente para eliminar todos los residuos de detergente. Posteriormente fueron desinfectadas en una solución de Povidin (Yodo-povidona) 1 % durante 60 minutos, fueron transferidas a una solución de Fungicidas (Phyton 0,5 ml l^{-1} + Carbendazim 0,5 ml l^{-1}), antioxidantes (Ácido ascórbico + Ácido cítrico 0,1 g l^{-1}), 30 gotas de Kilol (*Citrus paradisi*) y carbón activado 0,5 g l^{-1} durante 20 minutos. Las yemas se colocaron en una cámara de flujo laminar en dos soluciones de Hipoclorito de Sodio (NaOCl), la primera NaOCl 0,5 % durante 60 minutos, y la segunda NaOCl 1 % con adición de 3 gotas de Tween 20 durante 10 minutos, con 5 enjuagues de agua destilada estéril. Las yemas fueron sembradas en dos medios de cultivo MS y WPM e incubadas a 21°C durante 30 días (LCT-INIAP, 2014).

Fase de multiplicación. - Se cortaron explantes de 2-3 cm de longitud de las plantas obtenidas a partir de las semillas, los cuales fueron transferidos a diferentes medios de cultivo, MS y WPM sin adición de hormonas y con adición de 0,5 g l^{-1} y 0,1 g l^{-1} de BAP (Benziladenina) y ácido giberélico AG3 (Hernández, Lopera, Mora, Cárdenas, 1999). Se efectuaron 10 observaciones, con evaluaciones a los 30 y 45 días.

De las plantas obtenidas a partir de brotes se cortaron explantes de 1-3 cm de longitud, los cuales fueron transferidos a medios de cultivo, MS y WPM sin adición de hormonas y con adición de 0,5 g l^{-1} y 0,1 g l^{-1} de BAP (Benziladenina) y ácido giberélico AG3 (Hernández et al., 1999).

Incubación y fotoperiodo de vitroplantas. - En la fase de multiplicación se colocaron 5 explantes por frasco, se selló con papel parafilm para evitar la contaminación, se mantuvieron en el cuarto de cultivo con intensidad lumínica de 2000 luxes y a una temperatura de 18°C y 21 % de humedad. Las plantas se evaluaron cada 30 días.

5 Diseño experimental y análisis estadístico

Para el análisis se empleó un Diseño Completo al Azar (DCA), para la primera fase el arreglo factorial fue (3x2) con seis tratamientos y una segunda fase con un arreglo factorial (2x2x3) con 12 tratamientos. Se utilizaron 10 observaciones en cada fase.

Para los datos se realizó un análisis de varianza (ADEVA) y separación de medias al 95 % de probabilidad. Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se efectuó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($p<0,05$). Los datos que presentaron valor de 0 fueron transformados con la fórmula $\sqrt{x+1}$, con el propósito de disminuir el coeficiente de variación y ajustar los datos a la distribución normal (Vinueza, 2013).

6 Resultados y Discusión

6.1 Fase de Desinfección y Establecimiento en Semillas

Varias investigaciones realizadas por la División de Estadística del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) mencionan que los estudios de laboratorio que usan las siguientes medidas de control: material experimental homogéneo, control de factor externo, la asignación de pocas unidades experimentales a los tratamientos y el refinamiento de las técnicas aplicadas en la investigación, dan como resultado que se mantenga un mismo error experimental o que sea factible reducir el factor error y mantenerlo bajo control. Las investigaciones del error experimental usado como ejemplo de procesos indican claramente que la investigación del error no puede ser parte incidental de un proceso completo, sino que debe considerarse como una actividad más dentro del marco de las técnicas generales que se han de aplicar durante cualquier clase de investigación (Guzmán, 1975).

Las variables evaluadas en esta fase fueron porcentaje de contaminación, oxidación, germinación y longitud de brote.

| Tratamiento | Protocolo | Medio | Porcentaje de contaminación | Porcentaje de oxidación | Porcentaje de germinación | Longitud de brote (cm) 30 días | Longitud de brote (cm) 45 días |
|-------------|---|-------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| T1×10REP | Povidin solución 1% 60' + Fungicidas (Phyton 1 ml l ⁻¹ agua destilada + Carbendazim 1 ml l ⁻¹ agua destilada) 60' + NaOCl al 1% + Tween 20 10'. | MS | 0 | 0 | 100 | 1,22±0,03 | 1,37±0,05 |
| T2×10REP | Povidin solución 1% 60' + Fungicidas (Phyton 1 ml l ⁻¹ agua destilada + Carbendazim 1 ml l ⁻¹ agua destilada) 60' + NaOCl al 1% + Tween 20 10'. | WPM | 20 | 0 | 100 | 1,22±0,03 | 1,44±0,05 |
| T3×10REP | Povidin solución 1% 60' + Kitol 30 gotas l ⁻¹ + agua destilada 30' + Benomil 1 g l ⁻¹ + NaOCl 3% 10'. | MS | 0 | 0 | 100 | 1,33±0,03 | 1,47±0,05 |
| T4×10REP | Povidin solución 1% 60' + Kitol 30 gotas l ⁻¹ + agua destilada 30' + Benomil 1 g l ⁻¹ + NaOCl 3% 10'. | WPM | 0 | 0 | 100 | 1,27±0,03 | 1,40±0,05 |
| T5×10REP | Povidin jabón 1% 30' + Fungicidas (Benomil 1 g l ⁻¹ agua + Phyton 0,5 ml l ⁻¹ agua destilada) 30' + NaOCl 1% 8'. | MS | 20 | 0 | 100 | 1,07±0,03 | 1,14±0,05 |
| T6×10REP | Povidin jabón 1% 30' + Fungicidas (Benomil 1 g l ⁻¹ agua + Phyton 0,5 ml l ⁻¹ agua destilada) 30' + NaOCl 1% 8'. | WPM | 10 | 0 | 100 | 1,15±0,03 | 1,35±0,05 |

Tabla 1.

Variables evaluadas en la etapa de desinfección y establecimiento in vitro de semillas de *B. incana*.

La contaminación por hongos y/o bacterias se evidenció en los tratamientos T2, T5 y T6 con un porcentaje del 100%. Los tratamientos T1, T3 y T4 dieron como resultado explantes libres de contaminación a los 30 días de evaluación. El porcentaje de oxidación para los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 y T6 fue del 0 %.

Los tratamientos T1, T3 y T4 reportaron un 100 % de germinación de semillas a los 30 días y dicho porcentaje se mantuvo hasta los 45 días. En los tratamientos T1 y T3 se utilizó el medio de cultivo MS y para el tratamiento T4 se utilizó el medio de cultivo WPM. Para la variable longitud de brote se realizó la prueba de Tukey 5 % para establecer rangos de significación, para T3 (MS) se evidenció mayor crecimiento con una media de 1,33 ± 0,03 cm. Para T4 (WPM) un crecimiento de 1,27 ± 0,03 cm y para T1 (MS) un crecimiento de 1,22 ± 0,03 cm a los 30 días de evaluación. A los 45 días, para T3 (MS) se evidenció un crecimiento con una media de 1,47 ± 0,05 cm. Para T4 (WPM) un crecimiento de 1,40 ± 0,05 cm y para T1 (MS) un crecimiento de 1,37 ± 0,05 cm.

Los resultados obtenidos en esta fase corroboran los mencionados por los autores. En el protocolo de Billard, Dalzotto y Lallana (2014), se utilizó NaOCl 1% 10' en semillas de Oncidium bifolium reportando 0 % de contaminación y oxidación; además menciona que al utilizar el medio de cultivo MS el porcentaje de germinación fue del 100 %; sin embargo, la longitud de brote fue menor en comparación con el tratamiento T3 y T4, esto pudo deberse a que González (2010), en su estudio con Musa paradisiaca menciona que el uso de fungicidas/ bactericidas (Phyton) a dosis mayores de 0,5 ml l⁻¹ podría retardar el crecimiento de los explantes, esto se debe a que provoca toxicidad en la planta al ser absorbido el producto rápidamente por las hojas y raíces, reduciendo la ramificación y provocando el deterioro de la planta. Estos resultados corroborarían los obtenidos en el tratamiento T1.

Por otro lado, en el protocolo de Soto, Valverde, Rojas y Gómez (2010), utilizaron NaOCl 3% 10' en semillas de Cedrela salvadorensis reportando 0 % de contaminación y oxidación; el NaOCl se recomienda

como desinfectante superficial ya que su mecanismo de acción permite el daño de la membrana celular de las bacterias, originando la lisis del microorganismo. Además, mencionan en su investigación que la germinación de semillas fue de 65 % para el medio de cultivo WPM y 100 % para el medio de cultivo MS, el medio de cultivo MS contiene una alta concentración de sales mientras que el medio de cultivo WPM contiene reducción de la cantidad total de sales minerales. La longitud de brote en el T3 fue mayor en comparación con el tratamiento T1 y T4.

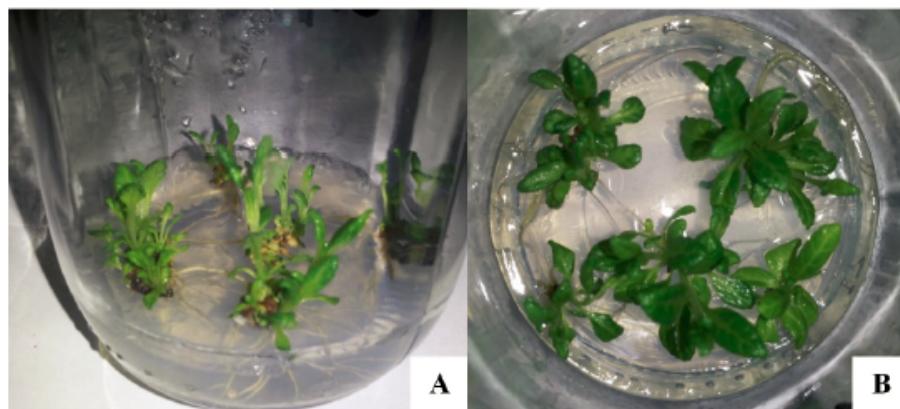


Figura 1.

A y B) Tratamiento T3. Plantas en medio de cultivo MS a los 30 días de evaluación.

7 Fase de Desinfección y Establecimiento de Brotes

Las variables evaluadas en esta fase fueron porcentaje de contaminación, oxidación, brotación, número de nudos y altura del brote.

| Tratamiento | Protocolo | Medio | Porcentaje de contaminación | Porcentaje de oxidación | Porcentaje de brotación | Número de nudos (30 días) | Longitud de brotes (30 días) |
|-------------|--|-------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------|
| T1×10REP | Povidin solución 1% 20' + Fungicidas (Benomil 1 g l^{-1} + Phyton 1 $ml\ l^{-1}$ + Rinfapicina 0,5 $ml\ l^{-1}$) 60' + Alcohol 70% 1' + NaOCl 2% 15'. | MS | 70 | 0 | 30 | 1,22±0,1 | 1,17±0,08 |
| T2×10REP | Povidin solución 1% 20' + Fungicidas (Benomil 1 g l^{-1} + Phyton 1 $ml\ l^{-1}$ + Rinfapicina 0,5 $ml\ l^{-1}$) 60' + Alcohol 70% 1' + NaOCl 2% 15'. | WPM | 50 | 0 | 50 | 1,30±0,1 | 1,27±0,08 |
| T3×10REP | Povidin solución 1% + Kitol 20 gotas l^{-1} agua destilada 30' + Benomil 1 g l^{-1} 90' + Alcohol 70% 30' + NaOCl 1% 15' + Carbón activado (0,5 g l^{-1}). | MS | 40 | 0 | 60 | 1,41±0,1 | 1,33±0,08 |
| T4×10REP | Povidin solución 1% + Kitol 20 gotas l^{-1} agua destilada 30' + Benomil 1 g l^{-1} 90' + Alcohol 70% 30' + NaOCl 1% 15' + Carbón activado (0,5 g l^{-1}). | WPM | 80 | 0 | 20 | 1,11±0,1 | 1,11±0,08 |
| T5×10REP | Povidin solución 1% 60' + Carbón activado 0,5 g l^{-1} + Fungicidas (Phyton 0,5 $ml\ l^{-1}$ + Carbendazim 0,5 $ml\ l^{-1}$) + Kitol 30 gotas/ 100 ml + Ácido ascórbico 0,1g l^{-1} 20' + NaOCl 0,5 % 60' + NaOCl 1 % 10' + Tween 20 | MS | 0 | 20 | 80 | 1,55±0,1 | 1,45±0,08 |
| T6×10REP | Povidin solución 1% 60' + Carbón activado 0,5 g l^{-1} + Fungicidas (Phyton 0,5 $ml\ l^{-1}$ + Carbendazim 0,5 $ml\ l^{-1}$) + Kitol 30 gotas l^{-1} + Ácido ascórbico 0,1g l^{-1} 20' + NaOCl 0,5 % 60' + NaOCl 1 % 10' + Tween 20 | WPM | 0 | 0 | 100 | 1,67±0,1 | 1,55±0,08 |

Tabla 2.

Variables evaluadas en la etapa de desinfección y establecimiento in vitro de brotes de *B. incana*.

La contaminación por hongos y/o bacterias se evidenció en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 con un porcentaje del 70, 50, 40 y 80 %, respectivamente. Para los tratamientos T5 y T6 los resultados mostraron explantes libres de contaminación a los 30 días de evaluación. El porcentaje de oxidación para los tratamientos T1, T2, T3, T4, y T6 fue del 0 %, mientras que para T5 fue del 20 %. El porcentaje de brotación para los tratamientos T5 (MS) y T6 (WPM) fue 80 y 100 %, respectivamente, para la variable número de nudos y altura de brote se utilizó la prueba de Tukey 5 % para diferenciar rangos de significación en donde se obtuvo una media de $1,61 \pm 0,1$ nudos y una media en longitud de brote para el medio de cultivo MS del $1,45 \pm 0,08$ cm y para el medio de cultivo WPM de $1,55 \pm 0,08$ cm. El hipoclorito de sodio fue efectivo para la desinfección de los brotes durante el establecimiento in vitro de *C. spinosa*. En esta fase del cultivo in vitro se pueden utilizar diferentes compuestos para la desinfección del material vegetal, siendo las soluciones de hipoclorito de sodio y el alcohol a diferentes porcentajes de los productos más comunes (Azofeifa, 2009).

Los resultados obtenidos en esta fase superan los mencionados por Cárdenas (2011), que menciona que utilizó brotes de Quishuar de plantas madre de dos años de edad, el proceso de desinfección fue con NaOCl 2,5 % por 10 min obteniendo un 70 % de sobrevivencia. En la presente investigación se utilizaron brotes de 1 año de edad y el protocolo de desinfección modificado del LCT-INIAP, obteniendo un 100 % de sobrevivencia. La oxidación en el tratamiento T5 pudo deberse a factores ambientales como la intensidad de luz, cortes, senescencia, metales pesados y lesiones que pueden desencadenar estrés oxidativo (Luna, Sansberro, Mroginski y Tarragó, 2003). Parada (2009), menciona en su estudio con *Prunus persica* que utilizando el medio de cultivo WPM se obtuvo un gran número de nudos (3-4) y su longitud fue de 13,7 mm, esto debido a que la alta concentración de sales en el medio de cultivo MS puede ocasionar un retardo en la brotación y puede ser tóxico para los tejidos como es el caso de *Vaccinium corymbosum*, especie que respondió mejor en el medio de cultivo WPM ya que contiene reducción de la cantidad total de sales minerales (Sedlak y Paprstein, 2009). En el tratamiento T6 (WPM) es en donde se observaron los mejores resultados.

8 Fase de Multiplicación

Las variables evaluadas en esta fase fueron altura de brote, número de nudos, índice de multiplicación y longitud de raíces. Se utilizaron las plantas obtenidas de la fase de establecimiento de semillas del tratamiento T3. El medio de cultivo MS sin adición de BAP (6-Bencilaminopurina) presentó el mejor resultado, obteniendo una altura de brote de $1,95 \pm 0,05$ cm y número de nudos $1,94 \pm 0,04$, seguido de MS sin adición de AG3 (Ácido giberélico) con una media de $1,78 \pm 0,05$ cm y número de nudos de $1,79 \pm 0,04$ a los 30 días de evaluación. Estos resultados son superiores a los mencionados por Cárdenas (2011), en donde menciona que la altura de brote obtenido fue de 0,4 cm y el número de nudos

de 1,25 utilizando MS sin adición de hormonas. En el estudio con *C. espinosa* la concentración de BAP (6-Bencilaminopurina) no influyó significativamente en el número de explantes brotados con respecto al tratamiento control. Sin embargo, la adición de 0,25 y 0,50 mg l⁻¹ de 6-BAP favoreció significativamente el número de brotes que se obtuvieron de un explante inicial. Se seleccionó como mejor tratamiento para esta fase del proceso la concentración más baja de BAP (6-Bencilaminopurina) 0,25 mg l⁻¹, con la cual se obtuvo un 96,6% de brotación y en 30 días de cultivo se logró un explante establecido y vigoroso con un promedio de 2,07 yemas brotadas con 6,71 cm de longitud (Núñez, Quiala, De Feria, Mestanza y Teanga, 2017).

El índice de multiplicación es la media aritmética del número de brotes generados a los 30 días en cada tratamiento. Para el medio de cultivo MS sin adición de BAP (6-Bencilaminopurina) fue de 2,60 y para MS sin adición de AG3 (Ácido giberélico) fue 2,38. El medio de cultivo MS sin adición de hormonas aseguró una tasa de multiplicación de 2,60.

García et al. (2018), menciona que los medios de cultivo complementados con hormonas como el BAP (6-Bencilaminopurina) aseguraron la proliferación de yemas axilares, pero también causaron efectos fisiológicos (crecimiento del callo abundante en la base de las plántulas, siendo esto negativo) como se evidenció en los tratamientos con adición de BAP (6-Bencilaminopurina) al 0,1 g l⁻¹. Diferentes autores refieren el efecto positivo del 6-BAP y el ANA (ácido 1-naftalenacético) para la multiplicación in vitro de otras especies leguminosas arbóreas, tal es el caso de Rahman, Hossain, Biswas, Joarder e Islam (1993), los cuales durante el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *C. pulcherrima*, informaron de un coeficiente de multiplicación de 5.8 nuevos brotes/explante con un medio de cultivo MS combinado con 1,0 mg l⁻¹ de BAP (6-Bencilaminopurina) + 1,0 mg l⁻¹ de ANA (ácido 1-naftalenacético).

Agramonte et al. (2001), al evaluar el efecto de diferentes dosis de 6- BAP (0; 0,35; 0,50 y 1,0 mg l⁻¹) en la multiplicación in vitro de *Eucaliptus grandis*, observaron una tendencia al aumento de los valores de la variable número de brotes por explante y una disminución de la longitud de los mismos con el aumento de la concentración, demostrando que dosis relativamente altas inducen a un alto ahijamiento axilar y reducen el tamaño del brote, lo que produce una afectación del coeficiente de multiplicación.

El promedio más alto para la longitud de raíces fue para el medio de cultivo MS sin adición de hormonas con una media de 2,25 ± 0,11 cm. Saucedo, Ramos y Reyes (2009), en su investigación con *Xanthosoma sagittifolium*, mencionan que en la fase de enraizamiento el uso de medios de cultivo sin adición de BAP (6-Bencilaminopurina) desarrollaron raíces más largas obteniendo un promedio de 4,5 cm. El uso de BAP (6-Bencilaminopurina) provocó síntomas de hiperhidridad en las plantas.

En general, Murashige y Skoog (1962) plantearon que el manejo de la concentración de las sales minerales es ampliamente recomendado para

estimular el enraizamiento, la formación de yemas, hojas y la longitud de las plantas in vitro; mientras que Piqueras y Debergh (2000) señalaron que la concentración de sales minerales puede afectar la morfología de las plantas micropropagadas mediante cambios en la presión osmótica, afectando principalmente el desarrollo de las raíces in vitro.

Jiménez, Silva, Borges y Fonseca (2016) en su estudio con *Dianthus caryophyllus*, al evaluar el efecto de la concentración de sales inorgánicas del medio de cultivo en relación con la longitud de la planta no observaron diferencias entre los tratamientos, excepto con el testigo, por lo que es posible que tuviera los nutrientes necesarios para el crecimiento de la misma. Sin embargo, se apreció una reducción del crecimiento con la disminución de la concentración de sales minerales, siendo menor en el tratamiento donde se utilizó al 25%. Estos resultados demuestran que la disminución del contenido mineral en los medios de cultivo favoreció el retardo del crecimiento, debido a alteraciones que ocurren en el metabolismo celular.



Figura 2.

A) Multiplicación de vitroplantas en medio (MS) sin adición de hormonas. B) Evaluación longitud de raíces. C) Formación de callo en la base de plantas en medio (MS) con adición de BAP ($0,1 \text{ g l}^{-1}$).

9 Conclusiones

Para la fase de desinfección y establecimiento in vitro de semillas de *Buddleja incana* el mejor tratamiento fue T3 (Povidin solución 1% 60' + Kilol 30 gotas l^{-1} + agua destilada 30' + Benomil 1 g l^{-1} + NaOCl 3% 10'), con un índice de contaminación de 0 % e índice de supervivencia 100 %. El tratamiento T3 contenía un medio de cultivo MS que resultó efectivo para la variable longitud de brote, ya que los valores más altos fueron de $1,33 \pm 0,03 \text{ cm}$ a los 30 días y a los 45 días de $1,47 \pm 0,03 \text{ cm}$. De acuerdo con Jiménez, Castillo, Tavares, Guevara y Montiel (2001), es importante tener en cuenta la zona del tejido que se utiliza para iniciar el cultivo in vitro, ya que ejerce gran influencia en la eficiencia de la desinfección.

En la fase de establecimiento in vitro de brotes de *Buddleja incana* el mejor tratamiento fue T6 (Phyton 0,5 ml l^{-1} + Carbendazim 0,5 ml l^{-1}) + Kilol 30 gotas l^{-1} + Ácido ascórbico 0,1g l^{-1} 20' + NaOCl 0,5 % 60' + NaOCl 1 % 10' + Tween 20) con 0% de contaminación. El porcentaje de brotación en dicho tratamiento fue del 100 %. El número y longitud de brotes tuvieron una media de $1,67 \pm 0,1$ brotes/explante y de $1,55 \pm 0,08$

cm de longitud. En el trabajo realizado por Gutiérrez (2002), en la especie *Alnus acuminata* a partir de segmentos nodales y hoja, se empleó un protocolo de desinfección con concentraciones muy similares de NaClO y tiempos propuestos en el protocolo de Marulanda e Isaza (2004). Los resultados indicaron que el tratamiento de desinfección con NaClO al 1 % produjo menor oxidación en las hojas que en los segmentos nodales.

En los ensayos de multiplicación in vitro de *Buddleja incana*, el medio de cultivo MS presentó los mejores resultados en los tratamientos sin adición de las hormonas BAP y AG3. La longitud de brote presentó una media de $1,95 \pm 0,05$ cm, el número de nudos presentó una media de $1,94 \pm 0,04$ nudos/explant e índice de multiplicación de 2,60. Los resultados obtenidos en la fase de multiplicación mostraron que no se requirió de un medio promotor de enraizamiento ya que la longitud de raíces presentó una media de $2,25 \pm 0,08$ cm.

Esta investigación representa una fase inicial de establecimiento y multiplicación in vitro, en dónde los resultados indican una probabilidad de éxito en el proceso de micropropagación de esta especie, sin embargo, aún deben realizarse estudios de viabilidad en campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D., Delgado, L., Trocones, A., Pérez, M., Ramírez, D., Gutiérrez, O. 2001. Micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales. *Biotecnología vegetal* Vol 1 N°2: 109-114.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20 (1): 153-175.
- Billard, C.E., Dalzotto, C.A., Lallana, V.H. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Revista Polibotánica*, 38: 145-157.
- Cárdenas, M. 2011. Determinación del protocolo de establecimiento y multiplicación in vitro de Quishuar (*Buddleja incana*) a partir de yemas axilares de plantas madre, como una herramienta para la preservación de esta especie dentro del Distrito Metropolitano de Quito. *Tesis de Ingeniería en Biotecnología*, Escuela Superior Politécnica del Ejército, Quito, Ecuador.
- Delgado, M., Hechenleitner, P., y Thiers, O. 2008. Propagación vegetativa de tajique (*Desfontainia spinosa*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. *Revista Bosque*, 29 (2): 120-126.
- Gárate, M. 2010. Técnicas de propagación por estacas. *Tesis de Ingeniero Agrónomo*, Universidad Nacional de Ucayali. Ucayali, Perú.
- García, L., Moreno, L., Pérez, M., La O, M., Padrón, Y., Rodríguez, Y., Rivero, L. 2018. Protocolo para la micropropagación de *Anthurium cubense* Engler a partir de semilla botánica. *Biotecnología Vegetal* 18 (3): 161-166
- Gómez, M. 2006. Evaluación de alternativas silvopastoriles utilizando yagual (*Polylepis racemosa*), Quishuar (*Buddleja incana*), colle (*Buddleja coriacea*) en la microcuenca del Río Chimborazo. *Tesis de Ingeniero Agropecuario*, Escuela Politécnica del Ejército. Riobamba, Ecuador.

- González, H. 2010. Evaluación de la eficacia in vitro de productos naturales y químicos en el control de especies fúngicas que afectan al cultivo de *Musa paradisiaca*. Informe técnico (1):1-24
- Gutiérrez, LG. 2002. Embriogénesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K. y estudio de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia; 300.
- Guzmán M. 1975. El error experimental en la investigación científica: Cuantificación de elementos contribuyentes. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.
- Grijalva, J., Ramos, R., Checa, X., Anti, A., Barrera, P., y Telenchano, A. 2012. Gestión sostenible de microcuencas en los Andes. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Programa Nacional de Forestería, Quito. Revista Informativa INIAP (7): 11-13.
- Hernández, C., Lopera, M., Mora, B., Cárdenas, J. 1999. Desarrollo de un protocolo para la propagación masiva de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Bent) mediante la utilización del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Revista Actual Biol 21 (70):3-12.
- Jiménez, L., Silva, J., Borges, M., y Fonseca, M. 2016. Conservación in vitro de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L) a partir de sales minerales. Revista Agronomía Mesoamericana 27 (1). doi: dx.doi.org/10.15517/am.v27i1.21897
- Jiménez, VM., Castillo, J., Tavares, E., Guevara, E., Montiel, M. 2001. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth a partir de explantes nodales. Memorias del Simposio Internacional Guadua. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Laboratorio de Cultivo de Tejidos (LCT-INIAP). 2014. Informe Técnico. Protocolos de desinfección de especies forestales. Informes Iniap (1): 20-60
- Luna C, Sansberro J, Mroginski L, Tarragó J. 2003. Micropropagation of *Ilex dumosa* from nodal segments in a tissue culture system. Biocell 27(2), 120-135.
- Marulanda., ML., e Isaza LV. Establecimiento in vitro de heliconias con fines de producción masiva. Scientia et Technica. 2004; 26: 193-197.
- Ministerio del Ambiente-MAE. 2005. *Informe técnico de árboles del Ecuador*. Ecuador.
- Murashige, T., y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiological Plantarum 15: 473-497
- Núñez, J., Quiala, E., De Feria, M., Mestanza, S., Teanga, S. 2017. Propagación in vitro de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz a partir de yemas axilares de árboles plus seleccionadas. Revista Biotecnología Vegetal, 17(2): 67-75.
- Parada, D. 2009. Propagación in vitro del híbrido Almendro x Durazno H1. Revista Fitotecnia mexicana , 32 (2): 103-109. 2017.
- Piquerás, A., y Debergh, P. 2000. Morphogenesis in micropyro Morphogenesis in micropropagation. In: Morphogenesis in Plant Tissue Cultures. Edited by Soh, W.-Y. and Bhojwani, S. S. Kluwers Academics Publishers pp. 443-462.
- Rahman, S M., Hossain, M., Biswas, BK., Joarder, OI., Islam, R. 1993. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture

- of mature tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 363-365; doi: 10.1007/BF00042301
- Reyes, H., y Hewstone, N. 1994. Cultura de tejidos en la agricultura. Revista Tierra Adentro No. 24, 30-33.
- Sánchez, Y. 2012. Elaboración de tablas de volúmenes y determinación de factores de forma de las especies forestales: Chuncho (*Cedrelinga catenaeformis*), Laurel (*Cordia alliadora*), Sangre de Gallina (*Otoba* sp), Ceibo (*Ceiba samauma*) y Canelo (*Nectandra* sp). *Tesis de Ingeniería Forestal*, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Saucedo, S., Ramos, L., y Reyes, T. 2009. Efecto de los reguladores de crecimiento para la propagación in vitro de Malanga (*Xanthosoma sagittifolium*). *Revista Cienica y Tecnología* (1) 1: 17-21.
- Sedlak, J., Paprstein, F. 2009. *In vitro* multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) cultivars. Acta Hortic. 810, 575-580. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.810.76
- Soto, B., Valverde, L., Rojas, A., y Gómez, A. 2010. Establecimiento in vitro de *Cedrela salvadorensis*. *Revista Tecnología en marcha*, 23 (4): 66-73.
- Vallejo, S. 1988. Micropropagación de tejidos vegetales de Quishuar (*Buddleja incana*), Cedro (*Cedrela montana*) y Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis*). *Tesis de Ingeniería Agrónoma*, Escuela Politécnica de Chimborazo. Quito- Ecuador.
- Vinueza, D. 2013. Evaluación morfológica e histológica de las etapas de formación de la embriogénesis somática en las variedades Duke 7 y Puebla de aguacate (*Persea Americana* Mill). *Tesis de Ingeniería en Biotecnología*, Escuela Politécnica del Ejército. Quito- Ecuador.

Enlace alternativo

<https://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/31.2020.05>
(html)