



A4-282 Cultivo *in vitro* de la especie forestal amenazada *Peltogyne purpurea* Pittier. Un aporte para la conservación y preservación ambiental en Colombia.

Julián Esteban López Correa & Liliana Rocio Botero Botero

Universidad de Medellín.

jelopez@udem.edu.co; lbotero@udem.edu.co.

Resumen

Peltogyne purpurea pittier es una especie forestal considerada actualmente en peligro. El cultivo *in vitro* ha sido aceptado como una alternativa de propagación y conservación de plantas a nivel mundial, sin embargo, para esta especie, la muerte de los tejidos es frecuente por problemas de fenolización y recalcitrancia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes sales minerales, antioxidantes y aminoácidos, sobre el control de la fenolización en explantes de *P. purpurea*, así como el uso de las citoquininas BA y KIN, en la inducción y multiplicación de brotes. Los resultados evidenciaron el papel fundamental del medio de cultivo WPM con antioxidantes. Las citoquininas BA y KIN tuvieron un efecto sinérgico en la inducción y multiplicación de brotes. Este estudio evidencia la factibilidad del uso de la técnica de cultivo *in vitro* para la propagación de esta especie y se convierte en el primer reporte en Colombia como alternativa para su conservación y propagación.

Palabras clave: fenolización, recalcitrancia, antioxidantes, micropropagación, *Fabaceae*.

Abstract: *Peltogyne purpurea* Pittier is a forest species currently considered endangered. *In vitro* culture has been accepted as an alternative for the propagation and conservation of plant worldwide, however, for this species, the phenolization and recalcitrance are common problems. The objective of this study was to evaluate the effect of different mineral salts, antioxidants and amino acids on the control of phenolization in explants of *P. purpurea* and the use of cytokinins BA and KIN in the induction and shoot multiplication. The results showed the fundamental role of WPM culture medium with antioxidants. The KIN and BA had a synergistic effect in inducing shoot and multiplication. This study demonstrates the feasibility of using *in vitro* culture technique for the propagation of the species and becomes the first report in Colombia as an alternative for conservation and propagation.

Keywords: phenolization, recalcitrance, antioxidants, micropropagation, *Fabaceae*.

Introducción

Peltogyne purpurea Pitter (*Fabaceae*) es una especie forestal endémica de Colombia amenazada por el deterioro de sus poblaciones naturales (Cárdenas y Salinas, 2006) debido a los procesos de transformación del territorio generados por la expansión de la frontera agrícola, la cual es responsable del 75% de la pérdida de bosques naturales nativos en el país (Ordoñez, 2011). Actualmente, como alternativa de solución para la conservación de especies forestales amenazadas, se ha incentivado la búsqueda de estrategias de conservación *ex situ* que permitan generar bancos de germoplasma y disponibilidad de material vegetal para la reincorporación en habitats naturales.

La tecnología de cultivo de tejidos ha sido reportada como una técnica promisoriosa para la conservación y propagación *ex situ* de especies forestales, sin embargo las especies pertenecientes a la familia *Fabaceae* son consideradas difíciles de propagar por esta técnica, debido a su naturaleza recalcitrante (Balaraju et al., 2011) y la ocurrencia de

fenolización en los tejidos, dificultando el establecimiento del material vegetal bajo condiciones *in vitro* y la posterior inducción de procesos de micropropagación y rizogénesis (Prando *et al.*, 2014; Azofeifa, 2009). Es importante entonces, buscar alternativas para la propagación *ex situ* de *Peltogyne purpurea* como aporte a la búsqueda de estrategias para su conservación, generando con ello, un aporte valioso para el sector agrícola y forestal, enmarcado en la sostenibilidad de los procesos productivos y el medio ambiente.

Este estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de las combinaciones de sales basales, diferentes antioxidantes y aminoácidos sobre el control de la fenolización en explantes de *P. purpurea* y evaluar el efecto de las citoquininas BA y KIN en la inducción y multiplicación de brotes en cultivos *in vitro*.

Metodología

Material vegetal, obtención y desinfección de explantes: como material vegetal inicial fueron utilizadas plántulas de 30 días de edad de *P. purpurea*, obtenidas mediante germinación *ex vitro* de semillas maduras. Los explantes utilizados fueron nudos cotiledonares. Para los procesos de introducción y desinfección, estos se lavaron con solución jabonosa neutra por 30 minutos, posteriormente fueron expuestos a una solución del fungicida comercial Colizym® 1% (v/v) durante 30 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Para la desinfección superficial se utilizó una solución de hipoclorito de sodio 1% (v/v) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo los explantes fueron lavados 5 veces cada uno utilizando agua destilada estéril. Todo el procedimiento de desinfección fue realizado en cabina de flujo laminar horizontal.

Evaluación de la combinación de antioxidantes, aminoácidos, sales minerales y vitaminas en el control de la fenolización: los nudos cotiledonares provenientes de plántulas de 30 días de edad germinadas *ex vitro* fueron desinfectadas y posteriormente cultivadas en medio WPM y MS suplementado con diferentes concentraciones de ácido cítrico (50, 100 y 150 mg L⁻¹), ácido ascórbico (50, 100 y 150 mg L⁻¹) y L-cisteína (10, 20 y 30 mg L⁻¹) de manera individual y en algunas mezclas. El material vegetal fue cultivado a 25°C ± 2°C, fotoperiodo 24/0 horas (luz/oscuridad) y flujo de fotones fotosintéticos de 50 umol m⁻² s⁻¹ ± 10 umol m⁻² s⁻¹. La variable respuesta fue el contenido de fenoles, la cual se midió siguiendo la metodología planteada por Misra *et al.*, (2010), la cual está basada en la reacción colorimétrica de óxido – reducción de Folin Ciocalteu y expresa la concentración de fenoles en términos de ácido gálico equivalente (AGE). Los datos fueron tomados a los 30 días y se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y comparación LDS (P<0,05) empleando el paquete estadístico Startgraphics® centurión 5.1.

Efecto de la interacción de citoquininas sobre la inducción de procesos de micropropagación: nudos cotiledonares provenientes de plántulas de 30 días de edad germinadas *ex vitro* fueron desinfectados y posteriormente cultivados en medio WPM suplementado con 150 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 150 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y 10 mg L⁻¹ de L-cisteína. Las citoquininas evaluadas fueron BA (0,1-1,7 mg L⁻¹) y KIN (0,1-1,7 mg L⁻¹), de manera individual y en combinaciones, empleando un diseño factorial 2^K con punto central y tres repeticiones. Durante el tiempo de ensayo los tejidos fueron cultivados a 25°C ± 2°C, fotoperiodo 24/0 horas (luz/oscuridad) y flujo de fotones fotosintéticos de 50 umol m⁻² s⁻¹ ± 10 umol m⁻² s⁻¹. Las variables de respuesta evaluadas fueron: porcentaje de activación de yemas y/o procesos morfogénicos, número y longitud de brotes por explante a los 30 días de cultivo. Para el análisis de los datos se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y comparación LDS (P<0,05) empleando el paquete estadístico Startgraphics® centurión 5.1.

Resultados y discusiones

Respecto a los ensayos de control de la fenolización, la totalidad de los explantes, independientemente del tratamiento utilizado, manifestaron fenolización. Los resultados de la prueba ANOVA mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos aplicados. El ácido cítrico (150 mg L^{-1}), el ácido ascórbico (150 mg L^{-1}) y la L-cisteína (10 mg L^{-1}) mostraron de manera individual su capacidad de control de la fenolización. Respecto a las mezclas, la combinación de las mismas concentraciones de ácido cítrico, ácido ascórbico y L-cisteína, fue el tratamiento que presentó la menor concentración de fenoles ($0,044 \text{ mg mL}^{-1}$), expresados como unidades de ácido gálico equivalente. El uso de sales y vitaminas del medio WPM presentó menor concentraciones de fenoles independientemente del tratamiento de antioxidantes y aminoácidos.

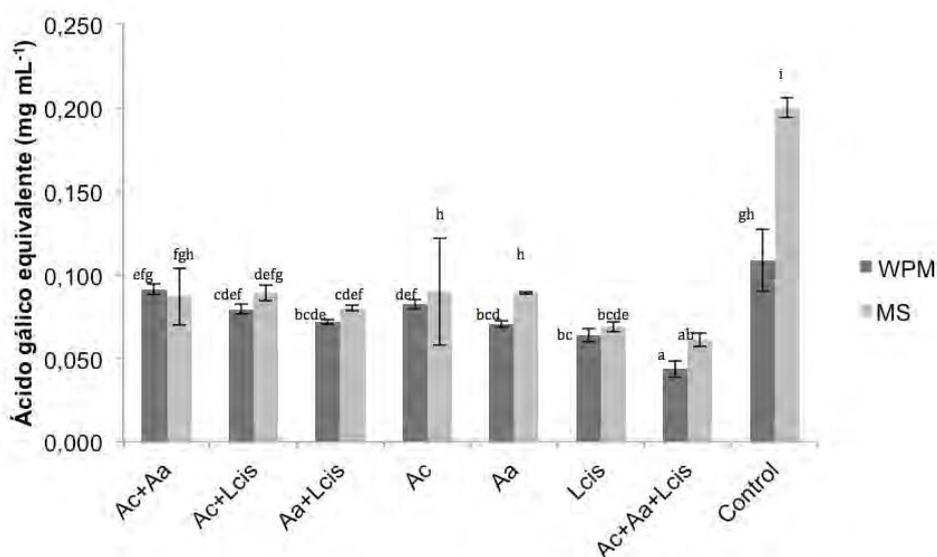


FIGURA 1. Las barras verticales representan las medias de la concentración de fenoles expresada como unidades de ácido gálico equivalente, en respuesta a tratamientos para el control de la fenolización. Ac (ácido cítrico), Aa (ácido ascórbico), Lcis (L-cisteína). Barras verticales representan los valores de las medias para cada uno de los tratamientos. Líneas verticales representan el error estándar. Letras diferentes indican significancia estadística ($P < 0,05$) LSD. Líneas verticales representan el desviación estándar.

Los resultados de este ensayo muestran una relación sinérgica entre antioxidantes, aminoácidos y las sales y vitaminas en los medios de cultivo, la cual fue más eficaz para controlar los procesos de fenolización en los explantes de *P. Purpurea*. Esto está en concordancia con los reportes de diversos autores quienes han utilizado este tipo de metodologías para el control de la fenolización en diversas especies vegetales, por ejemplo Kaur & Kant, (2000) reportan para la especie *Acacia catechu* Willd., la incorporación de ácido ascórbico (10 mg L^{-1}) al medio de cultivo, obteniendo una reducción de la producción de fenoles y oscurecimiento de los explantes, Sánchez & Salaverría (2004) reportan que el uso de antioxidantes y aminoácidos tuvo un efecto marcado en la sobrevivencia de explantes de *Fragaria x ananassa* Duch.

El uso de la citoquinina BA promovió el número de brotes por explante y la KIN la elongación de éstos, sin embargo la interacción entre BA (0,5 ppm) y KIN (0,4 mg L⁻¹) promovió procesos de organogénesis indirecta y evidenció la mayor inducción y elongación de brotes (3,0 brotes y 4,5 cm, respectivamente).



FIGURA 2. Múltiples brotes en nudo cotiledonar de *P. purpurea* cultivado en WPM suplementado con BA (0,5 mg L⁻¹) y KIN (0,4 mg L⁻¹).

TABLA 1. Resultados para el efecto de la interacción de citoquininas en la inducción de múltiples brotes en nudos cotiledonares de *P. purpurea* cultivados *in vitro*. Letras diferentes indican significancia estadística (P<0,05) LSD. ± indica desviación estándar. (+) respuesta positiva organogénesis, (-) respuesta negativa organogénesis.

BA (ppm)	KIN (ppm)	Porcentaje de respuesta	Organogénesis indirecta	Número de brotes explante	Elongación de brotes (cm)
0,1	0,1	33	(-)	1,0± 0,1 ^{ab}	1,2± 0,4 ^{ab}
0,1	0,7	66	(-)	1,0± 0,1 ^{ab}	1,8± 0,3 ^b
0,8	0,1	66	(-)	1,7± 0,6 ^b	1,3± 0,2 ^{ab}
0,8	0,7	33	(-)	0,7± 0,6 ^a	0,9± 0,4 ^a
0,5	0,4	90	(+)	3,0± 0,4 ^c	4,5± 0,7 ^c

Este estudio demostró que la mezcla de las citoquininas BA y KIN fue determinante para optimizar la inducción de múltiples brotes en nudos cotiledonares de *P. purpurea*, ya que se evidenció un incremento en los porcentajes de respuesta, número y elongación brotes por explante. Resultados similares han sido reportados en la literatura, donde la mezcla de estas dos citoquininas ha sido utilizada para la inducción de múltiples brotes en otras leguminosas forestales, así por ejemplo en los estudios reportados por Kaur y Kant, (2000) para la especie *Acacia catechu*, Vengadesan et al. (2002), para *Acacia sinuata* y Rajanna et al. (2011) para la especie *Bauhinia racemosa*, estos autores confirman la efectividad del uso conjunto de estos dos reguladores del crecimiento vegetal, los cuales permiten la ruptura de la dormancia en yemas así como la multiplicación y elongación de los brotes.

Conclusiones

La suplementación del medio WPM con ácido cítrico, ácido ascórbico y L-cisteína de manera individual o en combinación son efectivas en el control de procesos de fenolización en la etapa de establecimiento *in vitro* de nudos cotiledonares de la especie *P. purpurea* posibilitando el posterior desarrollo de un protocolo de propagación para la especie. En procesos de micropropagación bajo las condiciones de este estudio, los nudos cotiledonares son el tejido con mejor respuesta para la generación de brotes. La adición exógena de las citoquininas BA y KIN favoreció la inducción de múltiples brotes y su elongación.



Agradecimientos

A la Universidad de Medellín, Universidad CES, Vivero tierra negra y COLCIENCIAS por su soporte económico y a Erika Grajales por su apoyo técnico y a todo el personal del grupo de investigación GRINBIO.

Referencias bibliográficas

- Azofeifa álvaro (2009) Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro, *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153–175.
- Balaraju K, Agastian P, Ignacimuthu S, & Park K (2011) A rapid in vitro propagation of red sanders (*pterocarpus santalinus* L.) Using shoot tip explants, *Acta physiologiae plantarum*, 33(6), 2501–2510. [Http://doi.org/10.1007/s11738-011-0795-8](http://doi.org/10.1007/s11738-011-0795-8)
- Buendía González I, Orozco Villafuerte J, Cruz Sosa F, Chávez Ávila VM, & Vernon Carter EJ (2007) Clonal propagation of mesquite tree (*prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd. M.C. Johnston). I. Via cotyledonary nodes, *In vitro cellular & developmental biology - plant*, 43(3), 260–266. [Http://doi.org/10.1007/s11627-007-9027-8](http://doi.org/10.1007/s11627-007-9027-8)
- Vengadesan A, Ganapathi R, Prem A, & Ramesh A (2002) In vitro propagation of acacia sinuata (Lour.) Merr. Via cotyledonary nodes, *Agroforestry systems*, 55, 9–15.
- Kulneet K, & Kant U (2000) Clonal propagation of acacia catechu Willd. By shoot tip culture, *Plant*, 31, 143–145.
- Rajanna G, Sharanabasappa YN, Seetharam BA, & Mallikharjuna BP (2011) In vitro regeneration of cotyledonary node explant of *bauhinia racemosa*, *Botany research international*, 4, 75–80.
- Misra P, Toppo DD, Gupta N, Chakrabarty D, & Tuli R (2010), Effect of antioxidants and associated changes in antioxidant enzymes in controlling browning and necrosis of proliferating shoots of elite *Jatropha curcas* L., *Biomass and bioenergy*, 34(12), 1861–1869. [Http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.07.027](http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.07.027)
- Ordoñez MF (2011) Análisis de tendencias y patrones espaciales de deforestación en Colombia, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM. Bogotá D.C., Colombia.
- Prando AS, Chiavazza FA, & Contessa C (2014) Effect of coconut water and growth regulator supplements on in vitro propagation of *Corylus avellana* L., *Scientia horticulturae*, 171, 91–94. [Http://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.052](http://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.052)