

Determinación de tidiázurón (tdz) para la fase de multiplicación *in vitro* de caimito (*chrysophyllum cainito* L.).

Laura Parismoreno¹, Fabian Gordillo², Santos E.³

Fecha de recepción:
29 de agosto, 2016

Fecha de aprobación:
19 de octubre, 2016

Resumen

El caimito tradicionalmente se propaga de manera vegetativa mediante acodos, ya sea aéreo o terrestre, e injertos. El cultivo *in vitro* se utiliza para estimular el crecimiento y favorecer la formación de raíces. Se ha demostrado la eficiencia y aumento de la regeneración de brotes mediante el uso de tidiázurón (TDZ). Para lograr los objetivos propuestos, se obtuvieron explantes como yemas axilares y apicales; de los cuales se realizaron cortes de 4-5 cm para la siembra en medio de cultivo estéril. Se esperó que los explantes logren establecerse con varias hojas y observar yemas. Las yemas brotadas se replicaron en el medio de multiplicación MS ½; adicionando reguladores de crecimiento TDZ en dosis de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/L⁻¹, G₃ en dosis única de 1 mg/L⁻¹, Phytigel 2 g L⁻¹, sacarosa 40 g/L; y se mantuvieron a 25 °C y con intensidad de 5.000 lux durante 16 h/día. Las variables que se midieron fueron: número de brotación y longitud de los brotes a los 30 y 90 días después de iniciada la siembra. Los explantes tratados con 0.5 mg/l de TDZ, se logró el mayor número de brotes lo que evidenció la eficiencia de las fitohormonas.

Palabras Claves: Cultivo *in vitro*, propagación de plantas, tidiázurón

Abstract

Traditionally, caimito grows up in aerial or terrestrial elbos and graft. Caimito *in-vitro* crops are used to stimulate growing and favor roots formation. Efficiency and increase of sprouts regeneration have been proved to be higher by using thidiazuron (TDZ). Amid to reach the proposed goals, explants were obtained as auxiliary cuttings and apical from which 4 – 5 cm cuts were made to be sowed in sterile crops and then wait until explants settled in. The growing cuttings replicated themselves with a factor of MS ½ adding TDZ growing regulators of 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L-1 doses, G3 single doses of 1 mg/L-1, Phytigel 2 g/L-1, sucrose 40 g/L, all that at 25 C temperature and light intensity of 5000 lux over a 16 hours/day timestamp. The measured variables were: number of new sprouts and sprout's length (30 days period, 90 days period). The treated explants with 0.5 mg/L TDZ did get the higher number of sprouts with led us to conclude the efficiency of phytohormones.

Keywords: *In vitro* culture, plant propagation, thidiazuron

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Guayaquil, Campus Salvador Allende, Av. Kennedy y Av. Delta, laura.parismorenor@ug.edu.ec, Aparatado 090514, +59342883987, Guayaquil, Ecuador.

²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Guayaquil, Campus Salvador Allende, Av. Kennedy y Av. Delta, fabian.gordillom@ug.edu.ec, Aparatado 090514, +59342883987, Guayaquil, Ecuador.

³Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 via Perimetral, Apartado 09015863, Guayaquil, Ecuador.

Introducción

El caimito se le consume fresco, la pulpa de los frutos maduros es muy dulce, o se usa para hacer jaleas o mermeladas. Cuando se abre un caimito, no se debe permitir que el látex amargo de la piel del fruto se ponga en contacto con la pulpa comestible; en la tabla 1 se muestran los valores nutricionales del caimito.

El caimito tradicionalmente se propaga de manera vegetativa mediante acodos, ya sea aéreo o terrestre, e injertos, aunque las estacas leñosas maduras, se usan con mayor frecuencia para producir estacas arraigadas. El que cada célula pueda producir un clon, hace de la propagación tradicional una técnica con desventaja. Por ejemplo, (Haberlant, 1902), con la idea de la totipotencialidad celular, desarrolla el primer cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Informes de (Hernández y González, 2010) señalan que, las técnicas biotecnológicas pueden jugar un rol importante, para el suministro adecuado de vitroplantas como material de plantación. La germinación *in vitro* posibilita dicho proceso en condiciones asépticas y controladas en cualquier época del año, permitiendo disminuir el proceso de germinación así como obtener plántulas en condiciones fitosanitarias apropiadas

para trabajos de cultivo *in vitro*. Sin embargo, para el establecimiento exitoso de estas especies se hace necesario prevenir y controlar la contaminación microbiana y oxidación fenólica, ya que constituye uno de los problemas más graves en la micropropagación de frutales leñosos.

En el cultivo *in vitro* de tejidos se utiliza principalmente, para estimular el crecimiento y favorecer la formación de raíces. Sin embargo, la respuesta que se produce tras la aplicación del explante depende de la edad fisiológica del material vegetal, la naturaleza de las auxinas, concentraciones y tiempo de aplicación (Hartmann, Kester, Davies y Geneve 1996, p. 747).

Se ha demostrado en estudios realizados en muchas especies de la familia *Rosáceas*, en los que se resalta la eficiencia y aumento de la regeneración de brotes mediante el uso de tiazuron (TDZ) (Pati D, Haddad BR, Haegele A, Thompson H, Kittrell FS, Shepard A, Montagna C, Zhang N, Ge G, Otta K, McCarthy M, Ullrich RL, Medina D., 2004). Según (Alanoka, Minaño, Uberhuaga y Pérez, 2007) fue posible una tasa de regeneración de hasta ocho brotes por explanto utilizando TDZ, lo que sugiere la potencia de este biorregulador. Los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de 1.0 μMl^{-1} de TDZ.

Tabla 1. Valor nutricional por cada valor alimenticio por 100 g de la parte comestible

VALOR NUTRICIONAL DEL CAIMITO (100 g DE PULPA)								
Agua	82.0	g	Energía	68	Kcal	Proteína	1.8	g
Grasa	0.5	g	Calcio	21	mg	Fósforo	17	mg
Hierro	0.8	g	Vitamina A	5.0	mg	Vitamina B	0.04	mg
Vitamina B1	1.0	mg	Vitamina B2	0.03	mg	Vitamina C	11.0	mg
Thiamina	0.01	mg	Riboflavina	0.02	mg	Niacina	24.00	mg
Carbóno hidratos	14.90	g						

Experimentos de Paucar, (2011) señala que, en el presente estudio en mora de Castilla, el TDZ si bien es cierto provocó un número considerable de brotes regenerados por ser una *rosácea*, el BAP resultó más efectivo en lo que a número de brotes se refiere, hubo mayor crecimiento y número de brotes, esto se podría justificar porque el BAP, se encuentra entre una de las citoquininas más activas.

Con la inclusión de TDZ (5.0-0.5 μ M) durante dos semanas en el medio de germinación se produjo un incremento del número de embriones que desarrollaban brotes en detrimento de la formación de la radícula. Sin embargo, al disminuir la concentración de TDZ (0.1-0.05 μ M) y el tiempo de aplicación (una semana) se logró aumentar significativamente la tasa de embriones que desarrollaban plántulas favoreció también la respuesta de embriones que mostraban solo desarrollo de brotes, los cuales pueden aislarse y enraizarse siguiendo los métodos de micropropagación definidos. Además, se produjo la regeneración de yemas adventicias en los cotiledones de embriones tratados con TDZ (5.0-0.05 μ M), aumentando su incidencia con las concentraciones más elevadas. se utilizan reguladores de crecimiento como promotores de brotación y floración, tales como el thidiazuron (TDZ), los cuales se aplican en promedio unos 20 días antes de la brotación.

Materiales y métodos

Fase de Laboratorio.

Manejo del material vegetal en el laboratorio

Para llevar a cabo la siembra aséptica se utilizaron cuatro fases:

Fase 1. Selección de explantes iniciales

En este estudio se planteó, el uso de yemas axilares y apicales como explante. Estos explantes sirvieron para reproducir múltiples clones a medida que se sub-cultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo con características especiales que se desea mantener en el cultivo. (Debergh, P.C y Zimmerman, R.H, 1991).

Fase 2. Desinfección del material vegetal

Una vez determinada la planta madre, se obtuvieron los fragmentos de los que se sacó los explantes como yemas axilares y apicales. Se realizó una desinfección para eliminar los contaminantes externos (hongos y bacterias) que habitan en forma natural en el ambiente. De aquí en adelante se mantuvo en condiciones de asepsia. Trabajando en cabinas de flujo laminar para los respectivos lavados. A estos explantes, se eliminó las hojas de cada brote y se dividió en segmentos de hasta dos yemas para luego ser lavados y desinfectados bajo una llave de agua y a chorro continuo por 30 minutos, y en condiciones limpias fueron colocados en envases esterilizados de vidrio Pyrex hasta la siembra *in vitro*.

Para la siembra inicial, los explantes se colocaron en tubos de ensayo, y luego fueron cambiados a frascos tipo Gerber, tapados con papel aluminio y sellados con papel aluminio y sellados con tiras plásticas, todo esto previo a la esterilización en autoclave. Para todo el proceso de siembra *in vitro*, se utilizó el material estéril.

Fase 3. Siembra del material *in vitro*

Tras la preparación del material, se procede a los cortes y obtención del explante escogido de alrededor de 4-5 cm para la siembra en medio de cultivo estéril. En un

periodo de algunos días comenzó el proceso de germinación, o regeneración de nuevos tejidos vegetales iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2007).

Fase 4. Multiplicación de los brotes.

Durante esta fase se esperó que los explantes que lograron establecerse originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja se esperó observar yemas que se desarrollen luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente los nuevos brotes desarrollados se sub cultivaron en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en los frascos de cultivo obteniendo incremento exponencial, considerando que todos los factores que afecten el crecimiento hayan sido optimizados (Rossi, W., Weir, A., 2007).

Las yemas brotadas se repicaron en el medio de multiplicación MS ½ para inducir crecimiento axilar del brote; adicionando reguladores de crecimiento TDZ en dosis de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/L⁻¹, G₃ en dosis única de 1 mg/L⁻¹, Phytigel 2 g L⁻¹, sacarosa 40 g/L, como se observa en la tabla 2. Se utilizaron frascos de 200 ml. Los cultivos fueron mantenidos en un cuarto de crecimiento a 25 °C y con intensidad de 5.000 lux durante 16 horas por día.

Para el análisis estadístico, se utilizó el Diseño Completamente al Azar con cinco tratamientos (un tratamiento para cada dosis de TDZ). Las variables fueron:

Número de brotación por unidad experimental. Se procedió a contar el número de brotes por explante dentro de la unidad experimental (frasco) a los 30 y 90 días después de iniciada la siembra.

Longitud de los brotes el tamaño de los brotes se midió en centímetros desde la base hasta el extremo apical a los 30 y 90 días después de iniciada la siembra.

Análisis Estadístico.

Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) para una distribución de los tratamientos completamente al azar, mediante el programa INFOSTAT-Software estadístico, y se utilizó la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad para la separación de los promedios y determinación del mejor tratamiento.

Resultados y discusión

Brotación en la fase de multiplicación.

Una vez establecido el cultivo, pasaron a la fase de multiplicación; sub cultivando los explantes y generando la cantidad suficiente

Tabla 2. Tratamientos ensayados en la fase de multiplicación con medio ms ½, hormonas de multiplicación y crecimiento

Tratamientos	TDZ mg/L ⁻¹	G3 mg/ L ⁻¹
T ₁	0	0
T ₂	0.5	1
T ₃	1.0	1
T ₄	1.5	1
T ₅	2.0	1

de brotes en los tratamientos respectivos. Se evaluaron cinco tratamientos, con dos muestras cada uno, que corresponde a las cinco concentraciones usadas de TDZ, las mismas que fueron evaluadas en el medio basal MS $\frac{1}{2}$ previamente seleccionado en la fase de establecimiento ya que resultó con mejor respuesta a la investigación de inicio.

Los resultados para la fase de multiplicación se muestran en la figura 1 donde se pudo observar que el mejor tratamiento para los 30 y 90 días fue con la concentración de 1.5 mg/L⁻¹ de TDZ, como manifiestan García, L., Pérez Ponce, J., Bermúdez, I., Orellana, P., Veitía, N., García, L., Padrón, Y., y Romero, C. (2002) que para la inducción de yemas adventicias, el TDZ fue significativamente superior a todas las citoquininas ensayadas, esto concuerdan con este ensayo ya que se produjo la regeneración de yemas adventicias en los cotiledones de embriones somáticos tratados con TDZ (5.0 y 0.05 μ M), aumentando su incidencia con las concentraciones más elevadas, igual resultado indica (Huetteman y Preece, 1993) en la que informa que en el grupo el de la

thidiazolureas se encuentra el TDZ, un compuesto con actividad de citocinina, el cual es más efectivo que las citoquininas naturales en la promoción de desarrollo de yemas axilares, o en las diferenciación de yemas adventicias en cultivo *in vitro*.

En lo relacionado al tratamiento con 0.50 de TDZ no existe brotación a los 90 días. Una característica de este árbol es que produce un flujo exudado lechoso, lo que se evidenció claramente cuando el explante presentó desarrollo caulinar, fue entonces cuando ocurrió la caída de las hojas ya formadas, por lo tanto esto no permitió que la vitroplanta se desarrolle con mas vigor. Posterior a la evaluación fue necesario proceder al cambio inmediato a otro medio de cultivo fresco para evitar la muerte de la vitroplanta debido a la presencia de la antes mencionada sustancia de color crema, esto permitió la evidencia nuevamente del desarrollo de nuevos brotes para este tratamiento.

En cuanto al número de brotación se pudo observar que el tratamiento que presentó el mejor promedio fue el que corresponde a la concentración de 1.5 mg/L⁻¹ de TDZ a pesar

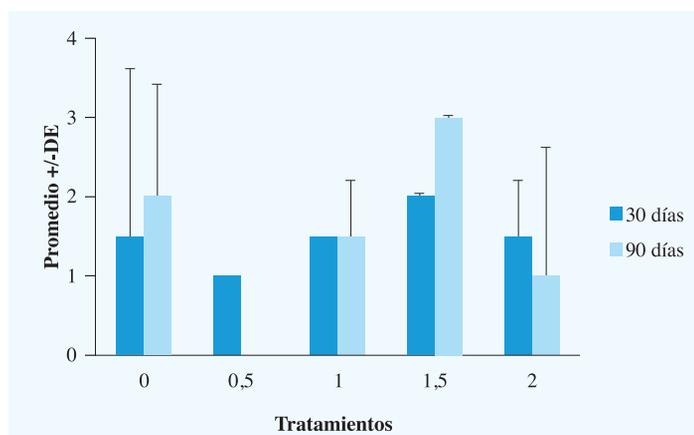


Figura 1. Fase de multiplicación, promedio de cantidad de brotes y yemas elongadas

de no haber diferencias significativas entre tratamientos. Estos resultados son similares a los reportados por (Paucar, 2011), quien señala que trabajando con mora de Castilla *Rubus glaucus* Benth, y TDZ obtuvo un número considerable de brotes regenerados.

Los resultados de la longitud de los brotes en el medio de multiplicación se presentan en figura 2 donde se puede observar que el tratamiento con la concentración de 1.5 mg/L⁻¹ de TDZ fue el que mejor comportamiento presento a los 30 y 90 días después de la siembra, mientras que los tratamientos con 0.5, 1 y 2 mg/L⁻¹ presentaron similares resultados, todos los tratamientos fueron mejor que el control.

Longitud en la fase de multiplicación.

En la figura 2 se presentan los resultados de la longitud promedio de brotes, aquí se puede evidenciar que los tratamientos con las concentraciones de 1.5 y 0.5 mg/L⁻¹ de TDZ presenta diferencias significativas respecto al control a los 30 días. Mientras que a los 90 días no se observó dicha

diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y el control.

La producción de caimito presenta grandes expectativas de desarrollo al ser una planta perenne que no es demandante de suelos y climas, es decir que es fácilmente adaptable a diversas condiciones ambientales.

Conclusiones

Se logró información valiosa en cuanto a problemas de microorganismos, sistemas de desinfección, problemas de oxidación, efecto de formulaciones de medios de cultivo, fitohormonas, así como la producción de brotes, longitud de ápices y yemas axilares del árbol de caimito.

Los explantes tratados con 0.5 mg/l de TDZ, se logró el mayor número de brotes lo que evidenció la eficiencia de las fitohormonas.

Referencias

Alanoka, N., Minaño, S., Uberhuaga, E y Pérez, C. (2007). Efectos de Thidiazuron en la generación *in vitro* de plántulas

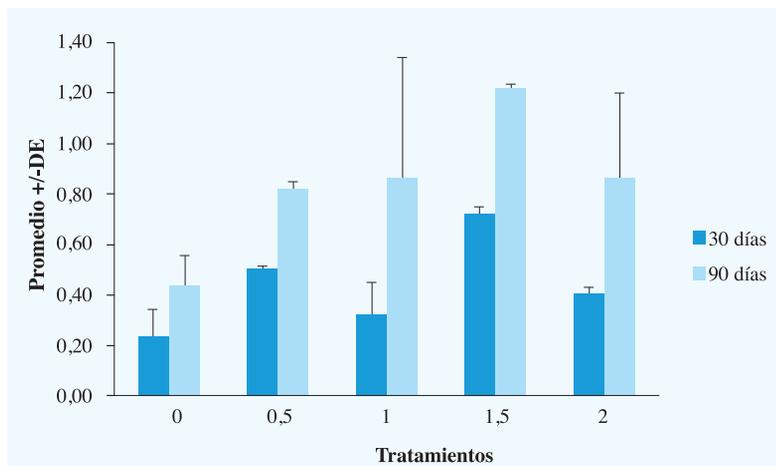


Figura 2. Fase de multiplicación, promedios de longitud de brotes

- de *Spathiphyllum wallisii*. VII reunión Sociedad Española de cultivo de tejidos *in vitro* de tejidos vegetales. Libro/resúmenes. Alcalá de Henares.
- Castillo, A. (2007). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *AGRIS*, 382. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=UY2006005431>
- Debergh, P. y Zimmerman, R. (Eds.), (1991) *Micropropagation: Technology and Application*. Dordrecht, Países Bajos: Springer Netherlands.
- García, L., Pérez, J., Bermúdez, I., Orellana, P., Veitía, N., García, ... Romero, C. (enero-marzo de 2002). Desarrollo de yemas adventicias en banano (*Musa* sp.) cv. Gran Enano (AAA). *Biotecnología Vegetal*, 2(1), 47-49. Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/130/110>
- Haberlandt, G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J.* 111, pp. 69-92.
- Hartmann, H., Kester, D., Davies F. y Geneve, R. (1996). *Plant propagation principles and practices* (6ª ed.). New Jersey, USA: Prentice Hall.
- Hernández, Y. y González, M. (2010). Efectos de la Contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *In Vitro* de frutales Perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 58-69. Recuperado de <http://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/78>
- Huetteman, C. y Preece, J. (mayo de 1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* [Resumen], 33(2), 105-119. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01983223>
- Pati, D, Haddad, B., Haegele, A., Thompson, H., Kittrell, F., Shepard, A., ... Medina D. (15 de Agosto de 2004). Hormone-Induced Chromosomal Instability in p53-Null Mammary Epithelium. *Cancer Research*, 64, 5608-5616. Recuperado de cancerres.aacrjournals.org/content/cancer/64/16/5608.full.pdf
- Paucar, M. (2011). Organogenesis directa *in vitro* a partir de explantes de hojas de mora (*Rubus glaucus* Benth) (Tesis de grado, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí). Recuperada de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/5134>
- Rossi, W. y Weir, A. (23 de enero de 2007). New species of *Stigmatomyces* from various continents [Resumen]. *Mycologia*, 99(1), 139-143. Recuperado de <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15572536.2007.11832610?scrol=top&needAccess=true>

Para citar este artículo utilice el siguiente formato:

Parismoreno, L., Gordillo, F., y Santos, E. (julio-diciembre de 2016). Determinación de tidiazurón (tdz) para la fase de multiplicación in vitro de caimito (*Chrysophyllum cainito* L.). *YACHANA, Revista Científica*, 5(2), 25-31.