

Micropropagación *in vitro* de la guaba (*Inga insignis*) endémica de la provincia de Imbabura

Villamar. F. Lizeth. A., Ing. Peña Cristian¹ & Ing. – Mat. Romero Pedro¹

1 Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología,

Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. PO Box: 171-5-231-B. Sangolquí – Ecuador

Resumen

En el presente trabajo se desarrolló la micropropagación de *Inga insignis*, a partir de yemas. En la desinfección se aplicó: fungicida, alcohol al 70%, diferentes concentraciones de NaClO (1 y 1.5%v/v) y tiempos de inmersión (10 y 15 minutos); obteniéndose una descontaminación y viabilidad del 90% con NaClO al 1.5% v/v por 15 minutos. El medio de cultivo más efectivo en la fase de establecimiento fue el medio MS (Murashige & Skoog) frente al medio MS/2, suplementado con BAP (0, 1, 2 y 3 mgL⁻¹); siendo la concentración de 2 mgL⁻¹ de BAP la que obtuvo el menor tiempo para la formación y número de brotes. En la etapa de multiplicación se empleó medio MS con concentración fija de ANA (0.1mgL⁻¹) y carbón activado (1 gL⁻¹), variaciones en la concentración de BAP (0, 0.5, 1 y 1.5 mgL⁻¹) y GA₃ (0.5 y 1.0 mgL⁻¹); alcanzado influencia significativa del BAP a 1 mgL⁻¹ combinado con GA₃ a 1 mgL⁻¹, con el menor tiempo para la formación, mayor número y longitud de brotes. Para la etapa de enraizamiento se empleó diferentes concentraciones de IBA (0, 0.5, 1 y 1.5 mgL⁻¹), siendo la concentración de 1 mgL⁻¹ la que obtuvo un menor tiempo al enraizamiento, mayor longitud de la plántula, mayor longitud y número de raíces.

Palabras clave: *Inga Insignis*, endémica, micropropagación, medio murashige & skoog

INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país que debido a su situación geográfica posee varias regiones naturales (Costa, Sierra, Oriente e Insular) que generan diversos tipos de hábitats y ecosistemas, contribuyendo a una gran biodiversidad (MAE, 2010), pero producto de las actividades antropogénicas esta biodiversidad va desapareciendo. Un ejemplo de esto es el Cantón San Miguel de Urucuquí ubicado al noroccidente de la provincia de Imbabura, en donde en la actualidad se desarrolla el proyecto ciudad del Conocimiento Yachay, por lo cual el avance de la urbanización ha disminuido las área

verdes, una de las especies que ha reducido su población es la guaba (*Inga insignis*), la cual ha tenido relevancia en el estudio realizado por Toaquiza (2007), por poseer propiedades organolépticas importantes: mayor grados brix, mayor porcentaje de arilo, mayor número de vainas por racimos y resistencia a la principal plaga de estos árboles la mosca de la fruta, además esta es una planta endémica de los Andes ecuatorianos (de la Torre, 2008)

Conjuntamente estos árboles de guaba han tenido una creciente importancia en

los últimos años debido a sus interacciones biológicas.

Por lo cual se debe considerar su conservación, las técnicas de cultivo *in vitro* son una alternativa viable para esta especie debido a que poseen semillas recalcitrantes, haciendo imposible su almacenamiento por periodos prolongados (Pennington, 1997).

Por lo cual el presente trabajo tiene como objetivo establecer un protocolo micropropagación *in vitro* como una futura estrategia de conservación de esta especie.

METODOLOGÍA

Recolección del material vegetal

Los explantes utilizados fueron segmentos nodales de plantas de un año, previamente adquiridas por la facultad de Agronomía de la Universidad Central del Ecuador, las cuales fueron obtenidas por semillas de plantas élites, determinadas durante el estudio realizado por Toaquiza (2007). Se realizó una colecta manual, de plantas de guaba (*Inga insignis*) mantenidas en el invernadero de la misma facultad, de las cuales se seleccionaron aquellas plantas que presentan las mejores características fenotípicas, buen estado fisiológico y sanitario. Se recolectaron ramas de aproximadamente 5 a 10 centímetros y se las traslado al laboratorio.

Desinfección del material vegetal

Se obtuvo explantes de un tamaño de 2 a 3 centímetros, fueron sumergido en 0.6 % p/v de detergente comercial durante 20 minutos, se continuó con la inmersión en el fungicida sistémico Benomil-Benopac al 0.07%, el cual se mantuvo en agitación por 20 minutos. El siguiente paso fue someter a los explantes en etanol al 70% durante un minuto. Finalmente se

evaluaron la concentración de cloro 1 y 1.5% v/v a dos diferentes tiempos de inmersión (10 y 15 min). Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril con un tiempo de duración de un minuto cada uno después de cada solución desinfectante. Se evaluó la contaminación y viabilidad hasta los 21 días después de la siembra.

Inducción de brotes

Se empleó el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) al 100% y al 50% de la concentración de sales, con: 30 gL⁻¹ de sacarosa; 6 gL⁻¹ de agar; y diferentes concentraciones de 6 - Benzil Amino Purina (BAP) (0, 1, 2, 3 mgL⁻¹). Se evaluó el tiempo a la brotación y el número de brotes hasta 28 días después de la siembra.

Multiplicación de brotes

Se empleó el mejor medio de cultivo de acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa anterior (mayor número de brotes y menor tiempo de brotación).

Se adicionó: diferentes concentraciones de 6 – Benzil Amino Purina (BAP) (0, 0.5, 1, 1.5 mgL⁻¹) y de giberelina GA₃ (0.5, 1 mgL⁻¹), mientras que permaneció constante: la concentración de Ácido Naftalen Acético o ANA (0.1 mgL⁻¹), y carbón activado (1 mgL⁻¹).

Se realizó dos subcultivos y se valió a los 28 días después de la siembra el tiempo a la brotación, número y altura de los brotes.

Enraizamiento

Una vez obtenidos los nuevos brotes, fueron colocados en el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) al 50% de sales con 1.0 gL⁻¹ de carbón activado, y

diferente balance hormonal, sin ninguna concentración de citoquininas pero con diferente concentración de auxina, que fue el Ácido Indol Butírico o IBA (0.0, 0.5, 1.0 1.5 mgL⁻¹)

Todos los medios de cultivo de las diferentes fases fueron ajustados a un pH se ajustó a 5.8 ± 0.01 e incubados a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $60\% \pm 2$ de humedad relativa, 4000 luxes y con un fotoperiodo de 16/8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección del material

En esta fase se observó que el tratamiento con tiempo de inmersión de 15 minutos y 1.5% de hipoclorito de sodio fue el que menor número de explantes contaminados presento, como se observa en la figura 1, sin embargo el número de explantes contaminados no estuvo ligado a la concentración de hipoclorito de sodio ni al tiempo de inmersión ($p=0.4037$).

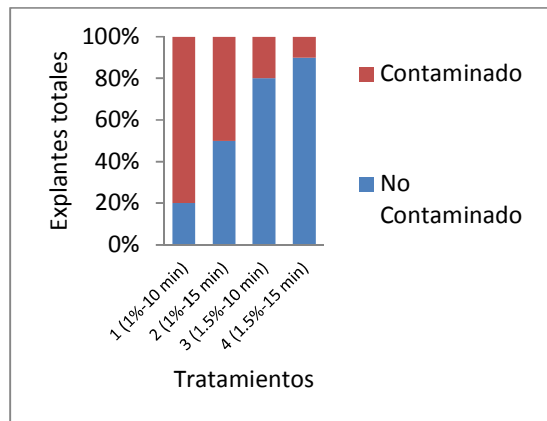


Figura 1. Porcentaje de contaminación en los explantes de guaba (*Inga insignis*), en función del tratamiento.

Similares resultados fueron obtenidos por Lozano (2011), en el estudio de propagación *in vitro* de guarango *Caesalpinia spinosa*, especie forestal perteneciente a la familia Fabaceae, en el

cual el tratamiento de desinfección más eficiente fue aquél que utilizó hipoclorito de sodio al 1.5% v/v y un tiempo de inmersión de 15 minutos, logrando un porcentaje de establecimiento de 67%, mientras que Patiño (2011), en la misma especie obtuvo el 100% de descontaminación al utilizar concentraciones de hipoclorito de sodio al 3.5% y 1.5% v/v por 2 minutos, alcanzando un porcentaje de supervivencia de 44%.

Por otra parte, ninguno de los tratamientos presento un alto porcentaje de explantes oxidados.

Establecimiento *in vitro*

El ANOVA efectuado al $\alpha=5\%$ durante esta etapa mostró que existió dependencia estadística ($p<0.0001$) para los factores medios de cultivo, dosis de BAP, y para la interacción de estos dos factores.

La prueba de Duncan al $\alpha=5\%$ (tabla 1) mostro que existió diferencia estadística significativa, obteniéndose en el medio de cultivo MS con la dosis de 2 mgL^{-1} de BAP la mejor respuesta vegetativa, es decir, un menor número de días los primeros brotes de *Inga insignis* (6.90 días), así como mayor número de brotes (4.70 brotes/explantes) (figura 1).



Figura 1: Observación de las variables de la etapa de establecimiento: A. Primer brote, B. Número de brotes.

Similares resultados se obtuvieron en otras especies de Fabaceae, en las que se evaluó los mismos medios de cultivo empleados en esta investigación, en los cuales obtuvieron mejor respuesta vegetativa en el medio MS completo (Altaf *et al.*, 2008; Lozano, 2011), lo cual se puede explicar porque el explante tiene una mayor concentración de nutrientes disponibles, siendo el medio Murashige y Skoog es el más utilizado en cultivo de tejidos vegetales, incluyendo especies forestales (Yasodha, Sumanthi, & Gurumurthi, 2004).

Tabla 1: tratamientos de la fase de establecimiento *in vitro* de *Inga insignis*.

Tratamiento	Medio cultivo	BAP mgL ⁻¹	Tiempo brotación (días)	# de brotes
1	MS	0	12.20	1.80
2	MS	1	9.30	1.80
3	MS	2	6.90	4.70
4	MS	3	10.20	3.30
5	M2/2	0	13.70	1.70
6	M2/2	1	12.50	2.90
7	M2/2	2	9.10	3.60
8	M2/2	3	13.10	2.70

Multiplicación

El análisis de varianza (ANOVA) realizado al 5% (tabla 3.25), indicó que la variación del tiempo a la brotación, en la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*), solo depende de la concentración de BAP, mientras que para las variables número y altura de brotes además influyó la concentración de GA₃ y el subcultivo. Por lo cual al realizar la prueba de Duncan al $\alpha=5\%$ (tabla 2) se halló que la dosis de 1 mgL⁻¹ de BAP combinado con 1 mgL⁻¹ de GA₃.

El factor dosis de GA₃ e interacción concentración de BAP – dosis de GA₃ no tuvo ningún efecto estimulante sobre el apareamiento de los primeros brotes,

similares observaciones se registró por Vengadesan y colaboradores (2008) en *Acacia sinuata*, esto podría deberse a que la principal función de las giberelinas es intervenir en los procesos de elongación de los entrenudos (Pierik, 1997).

Por otra parte, en la propagación *in vitro* de *Acacia mangium*, reporto que para el apareamiento de los primeros brotes, si existió influencia de la concentración de GA₃ y BAP, suplementado al medio de cultivo MS, en la misma dosis empleada en esta investigación (1.0 mgL⁻¹) (Nanda, Das, & Rout, 2004).

En el número de brotes (4.45 brotes/explante) se obtuvo resultados similares a las investigaciones realizadas por Arumugam & Panneerselvam (2012) en la micropropagación del árbol leguminoso *Clitoria ternatea*, Ortiz, Gonzáles, & Koch (2007) en *Acacia melanoxylon*, Joshi y colaboradores (2003), en *Dalbergia sissoo*, Indravathi & Pullaiah (2012) en *Albizia amara* en el que se alcanzó el máximo número de brotes en la fase de multiplicación aplicando la concentración de 1.0 mgL⁻¹ de BAP.

La altura máxima de brotes fue 4 cm, aunque en el estudio de micropropagación de *Albizia amara* (Indravathi & Pullaiah, 2012), no se empleó giberelinas, también se obtuvo la máxima altura (2.5 cm) cuando el medio de cultivo se suplemento con 1.0 mL⁻¹ de BAP. Mientras que en *Acacia mangium* por Nanda y colaboradores (2004) quien concluye que existió influencia de GA₃ con una dosis de 1.0 mgL⁻¹, la cual permitió el alargamiento de brotes adventicios sin producir deformación foliar.

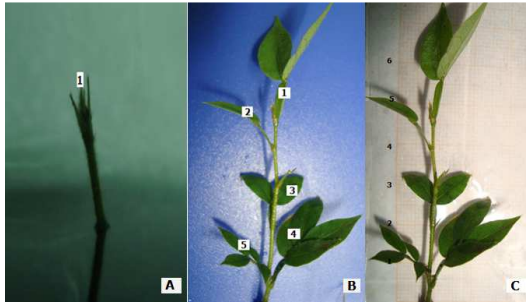


Figura 2: Observación de las variables en la fase de multiplicación: A. Primer brote, B. Número de brotes, C. Altura del brote.

De modo contrario en las investigaciones realizadas por Quorin, da Silva, Martins, Oliveira (2001) en *Acacia mearnsii* en la fase de multiplicación no hallaron influencia del GA₃ (0.5 y 1.0 mgL⁻¹) en la elongación de los brotes.

Tabla 2: tratamientos de la fase de multiplicación *in vitro* de *Inga insignis*.

Tratamiento	GA ₃ mgL ⁻¹	BAP mgL ⁻¹	Tiempo brotación (días)	# brotes	Altura brotes (cm)
1	0.5	0	10.7	1.75	2.47
2	1	0	10.6	2.20	3.01
3	0.5	0.5	9.8	1.90	2.49
4	1	0.5	9.4	2.75	3.02
5	0.5	1	8.1	2.80	2.98
6	1	1	7.8	4.45	4.00
7	0.5	1.5	8.4	2.45	2.93
8	1	1.5	8.7	3.60	3.90

Enraizamiento

El ANOVA efectuado al 5% de significancia señaló que el IBA influye significativamente en esta etapa. La prueba de Duncan ($\alpha=5\%$) mostró que la dosis más favorable fue la de 1 mgL⁻¹ al hallar el menor tiempo para la aparición de las primeras raíces (20.10 días) similar a lo obtenido en en *Daliberia sisso* (Joshi, Bisht, Sharma, & Uniyal, 2003). Estos resultados difieren a los obtenidos en *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* y *A. nilotica*

(Aziz, Omari, & Kafawin,, 2002) en *Cassia angustifolia* (Agrawal & Sardar, 2006), *Acacia ehrenbergiana* (Javed, Khan, & Aref, 2013) se halló la mejor respuesta con una concentración de 4.0, 2.5 y 1.5 mL⁻¹ de IBA respectivamente.

Así como mayor longitud de la plántula (4.39 cm), mayor longitud (5.11 cm) y número raíces/plántula (4.30), *Caesalpinia bonduc* (Santosh & Krishna, 2012). *Daliberia sisso* (Joshi, Bisht, Sharma, & Uniyal, 2003) y *Parapiptadenia rigida* (Kielser, Franco, Paranhos, Franco, & Santos, 2009), en los cuales la mayor longitud de raíz promedio (2.5 y 4.5 cm respectivamente), se consiguen con la dosis de 1.0 mgL⁻¹ IBA.

Sin embargo, los mejores resultados de la presente investigación difieren con los alcanzados por Shekhawat, (2012) en *Pithecellobium dulce*, en el cual la concentración de 2.5 mgL⁻¹ de IBA, consigue el mayor tamaño promedio de raíz (2.2 cm), en *Caesalpinia bonduc* la dosis de 4.0 mgL⁻¹ IBA, obtuvo el tamaño más grande de raíz promedio con 3.1 cm (Meena, Kochappan, Cheruvathur, Britto, & Thuruthiyil, 2010), así como en *Prosopis chilensis*, la concentración de 3.0 mgL⁻¹ de IBA es la que obtuvo mayor longitud de la raíz (6.5 cm) (Caro, Polci, Lindstrom, Echenique, & Hernandez, 2002).

en *Daliberia sisso*, en el cual el número máximo de raíces promedio fue 4.47, en la dosis de 1.0 mgL⁻¹ IBA, Quraishi y colaboradores, (2011) también hallaron a esta concentración como la mejor produciendo un número máximo de raíces promedio (3.5 raíces por plántula) en la especie *Cassia torioa*, de igual forma Ortiz y colaboradores (2007) en *Acacia melanoxylon* alcanzaron el mayor número de raíces con las dosis de 1.5 y 1.0 mgL⁻¹ con un número de raíces promedio por explante de 3.67 y 4.67.



Figura 3: Observación de las variables en la fase de enraizamiento: A. Primera raíz, B. Longitud de la plántula, C. Longitud raíz, D. Número de raíces.

Tabla 4: tratamientos de la fase de enraizamiento *in vitro* de *Inga insignis*.

Tratamiento	IBA mgL ⁻¹	Tiempo enraizamiento (días)	Longitud plántula	Longitud raíz	# raíces
1	0	40.70	3.22	1.35	1.30
2	0.5	24.10	3.75	3.02	2.10
3	1	20.10	4.39	5.11	4.30
4	1.5	22.50	4.33	4.05	4.20

Por otra parte, estos resultados difieren entre otras especies de este género debido a las diferentes respuestas *in vitro* de cada especie como en *Dalbergia sisso* (Meena, Kochappan, Cheruvathur, Britto, & Thuruthiyil, 2010) y *Pithecellobium dulce* (Goyal, Kachwaha, & Kothari, 2012), en el que se halló el máximo número de explantes promedio (4.3 y 3.4) con la dosis de 2.5 y 0.5 mgL⁻¹ IBA respectivamente.

CONCLUSIONES

El tiempo de inmersión y la concentración de hipoclorito de sodio no influyeron en la desinfección ($p < 5\%$), se apreció que el mejor tratamiento de desinfección para la micropropagación *in vitro* de yemas de *Inga insignis* es al emplear 1.5% de hipoclorito de sodio durante 15 minutos de inmersión, alcanzando un 90% de descontaminación y viabilidad.

El medio de cultivo más efectivo en la fase de establecimiento fue el MS ($p < 0.0001$), suplementado con 2 mgL⁻¹ de BAP ($p < 0.0001$), en el cual se obtuvo la mejor respuesta vegetativo con el menor tiempo para la formación de brotes de *Inga insignis* (media=7.87 días) y mayor cantidad de brotes (media=4.15 brotes por explante).

En la fase de multiplicación existió influencia de BAP a dosis de 1 mgL⁻¹ combinado con 1 mgL⁻¹ de GA₃ ($p < 0.0001$), mediante el cual se obtuvo el menor número de días para la formación de brotes de *Inga insignis* (media=7.80 días), así como mayor número (media=4.45 brotes por explante) y longitud de los brotes (media=4.00 centímetros).

Se encontró que en la fase de enraizamiento la concentración de 1mgL⁻¹ de IBA tuvo influencia significativa ($p < 0.0001$) en las variables tiempo al enraizamiento (media=20.10 días), longitud de la plántula (media=4.39 centímetros), longitud (media=5.11 centímetros) y número de raíz (media=4.20 raíces por plántula).

BIBLIOGRAFÍA

Altaf, H., Iqba, A., Qarshi, K., Hummer, N., & Ikram, U. (2012). Plant Tissue Culture:

Current Status and Opportunities. En Charper 1 (págs. 4-7). USA.

Caro, L., Polci, P., Lindstrom, L., Echenique, C., & Hernandez, F. (2002). Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from Young and mature plants. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, San Andrés –Argentina, 25- 33.

de la Torre, A. (2008). Enciclopedia de plantas utiles. Quito: Universidad Católica.

Goyal, P., Kachwaha, S., & Kothari, S. (2012). Micropropagation of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth—a multipurpose leguminous tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using molecular markers. Srivastava Foundation for Science and Society. India.

Indravathi, G., & Pullaiah, T. (2012). In vitro propagation studies of *Albizia amara* (Roxb.). Department of Biotechnology, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur, India, 505-513.

Indravathi, G., & Pullaiah, T. (2012). In vitro propagation studies of *Albizia amara* (Roxb.). Department of Biotechnology, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur, India, 505-513.

Lozano, Z. (2011). Establecimiento de un protocolo para la Propagación in vitro de guarango *Caesalpinia spinosa* (molina) kuntze, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de esta especie. Sangolquí – Ecuador. Tesis pregrado.

MAE, M. d. (2010). Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la diversidad Biológica. Quito: Manhtra editores.

Meena, U., Kochappan, L., Cheruvathur, J., Britto, J., & Thuruthiyil, D. (2010). Callus induction and shoot regeneration from epicotyl explants of ethnomedicinally

important *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. The Rapinat Herbarium and Centre for Molecular Systematics and Taxonomy, 263- 269.

Nanda, R., Das, P., & Rout, G. (2004). In vitro clonal propagation of *Acacia mangium* Willd. and its evaluation of genetic stability through RAPD marker. Plant Biotechnology Division, Plant Tissue Culture Laboratory, Regional Plant Resource Centre, Bhubaneswar, Orissa – India, 203-212.

Ortiz, O., Gonzáles, M., & Koch, L. (2007). Micropropagación de árboles superiores de *Acacia melanoxylon*. Instituto Forestal Chile, 146-153.

Patiño, M. (2011). Evaluación de métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Escuela Politécnica de Chimborazo. Riobamba Ecuador. Tesis pregrado.

Pennington, T., & Revelo, N. (1997). El género *Inga* en el Ecuador. Morfología, Distribución y Usos. Reino Unido: The Royal Botanic Gardens Kew.

Pierik, R. (1997). In vitro culture of Higher Plants. Netherlands: Kluwet Academic Publishers.

Quorin, O., da Silva, M., Martins, L., & Oliveira, A. (2001). Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. Issue 3, Volume 66, 199-205.

Quorin, O., da Silva, M., Martins, L., & Oliveira, A. (2001). Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. Issue 3, Volume 66, 199-205.

Rebolledo, V., Aparicio, A., & Cruz, H. (2006). Estudio preliminar para la propagación in vitro de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana* vol 8, 27-32.

Toquiza, J. (2007). Colección y establecimiento de una plantación piloto con germoplasma de guaba (*Inga* sp.) en

el cantón San Miguel de Urququí -
Imbabura, Ecuador. Quito: Facultad de
Ingeniería Agropecuaria.

Vengadesan, G., Ganapathi, A., Prem, H.,
Anand, R., Ramesh, L., & Anbazhagan, V.
(2008). In vitro organogenesis and plant
formation in *Acacia sinuata* (Lour.) Merr.
Plant Cell Tiss. Org. Cult., 23-28.

Yasodha, R., Sumanthi, R., & Gurumurthi,
K. (2004). Micropropagation for quality
propagule production in plantatio forestry.
Division of Plant Biotechnology, Institute
of Forest Genetics and Tree Breeding
Coimbatore, India, 151-156.