

## AVANCES EN MICROPROPAGACIÓN DE GUAYABO DEL PAÍS (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret).

Castillo<sup>1</sup> A., Cabrera<sup>2</sup> D., Rodríguez<sup>2</sup> P. y R. Zoppolo<sup>2</sup>.

1. Unidad de Biotecnología INIA “Las Brujas” Ruta 48 km 10. [acastillo@inia.org.uy](mailto:acastillo@inia.org.uy)
2. Programa Nacional de Frutales, INIA “Las Brujas”, ruta 48, km10.

El guayabo del país, (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret) ha sido identificada como una especie nativa de interés comercial; pero su desarrollo está limitado, dado que presenta gran variabilidad de genotipos que inducen heterogeneidad en la fruta producida tanto en calidad como en cantidad. Esto ha determinado la dificultad para la evaluación a gran escala del cultivo. Como forma de levantar esta restricción, se ha explorado la propagación de estacas de los genotipos preseleccionados. El éxito obtenido con las distintas técnicas de propagación vegetativa, ha sido variable, impidiendo el escalamiento productivo de los materiales para la generación de clones con valor comercial. Además, se han evaluado las técnicas de acodo, injerto y estaquillado de diverso tipo con bajos porcentajes de enraizamiento en función del genotipo y de la aplicación de auxinas. Con el fin de superar estas limitantes, se planteó la multiplicación *in vitro* de plantas como alternativa que asegure la reproducción de individuos conforme a la planta madre, manteniendo las características de interés productivo. Con el empleo de medios básicos sin hormonas, se obtuvo la introducción *in vitro* de 4 genotipos. Tres de ellos pasaron a la siguiente fase de multiplicación *in vitro*. En la fase de multiplicación se evaluaron dos citoquininas, se observaron diferencias en las respuestas de los genotipos. La zeatina proporcionó la tasa de crecimiento más alta en los tres genotipos seleccionados.

**Palabras clave:** *propagación, multiplicación in vitro, topolinas, zeatina*

### Introducción

Uruguay produce frutas frescas de diversas especies y de buena calidad. La producción abarca desde cítricos, frutales de hojas caducas (manzanas, peras, durazno, nectarino, ciruela y membrillo), arándanos, y uvas. Además de este tipo de producción de frutas de clima templado, Uruguay cuenta con frutas nativas, con gran potencial en los mercados de exportación como arazá pitanga, guabiyú y guayabo. En ese contexto, se desarrolla un programa de selección de frutas nativas con aptitud comercial, llevado adelante por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), la Facultad de Agronomía y el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Dentro de las especies en estudio se cuenta con materiales de ‘Guayabo del País’ (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret) preseleccionados por productividad y características del fruto. El guayabo es una especie predominantemente alógama, de manera que las plantas originadas de semilla segregan en las plantas hijas, las características presentes en el material original y no reproducen el mismo fenotipo (Finardi et al., 2002). Para obtener plantas uniformes e iguales a la planta madre, se puede utilizar la propagación vegetativa o clonal. En ese sentido, se han descrito sistemas de propagación por estaca con éxito variable, que va desde el 4 a más del 70% (Ducroquet et al., 2000). Otra forma de multiplicación clonal es a través de la micropropagación, sin embargo la multiplicación *in vitro* de esta especie ha sido dificultosa, y está fuertemente afectada por el genotipo (Ross y Grasso, 2010). Dentro de los componentes del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento y en particular las citoquininas, juegan un papel decisivo en el éxito del incremento en el número de plantas. Este grupo de hormonas son indispensables en la micropropagación de plantas donde su función es promover la división celular y el desarrollo

normal de los órganos (Plíhal et al., 2013). Una de las citoquininas más conocidas, es la N6-benciladenina (BA), utilizada en medios de cultivo para promover la producción de brotes secundarios (Köszeghi et al., 2014).

Sin embargo, en ensayos realizados con esta hormona, el resultado fue parcial, solo fue efectiva en un genotipo de un total de 5 materiales evaluados (Ross et al., 2013).

La zeatina es otra citoquinina, se encontró que era muy eficaz para la iniciación y multiplicación de brotes en especies del género *Vaccinium* y *Vitis* (Sökmen et al., 2013) además ha sido utilizada en algunas especies con éxito como el olivo donde se obtienen interesantes tasas de multiplicación (Ruggini, 1984) ; pero un factor a tener en cuenta es su alto costo (Bairu et al., 2007; Aremu et al., 2012). Un nuevo grupo de citoquininas aromáticas, las topolinas aparecen como reguladores de crecimiento muy eficaces, para llevar a cabo su aplicación en micropropagación. El uso de meta-topolina y sus derivados podrían sustituir la bencil adenina y zeatina. En este trabajo se compara el efecto de dos citoquininas la zeatina y la meta topolina en la fase de multiplicación del proceso de micropropagación.

## Objetivo

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar dos citoquininas en medios de multiplicación para estimar su efecto en diferentes genotipos de guayabo del país.

## Materiales y métodos

Se evaluó la introducción de 3 genotipos en dos condiciones, sobre plantas creciendo en invernáculo y plantas de la misma variedad creciendo en oscuridad. Desinfección: Se tomaron 20 yemas apicales de plantas creciendo en las dos condiciones para cada genotipo. Se evaluaron 3 materiales vegetales: 27-1, 20-2 y 154. Se realizó un enjuague con hipoclorito de sodio al 5% con dos gotas de Tween 20, durante 10 min incluyendo antioxidantes, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril con antioxidantes. Iniciación: el medio base de sales minerales utilizado fue Woody Plant Medium (WPM, Lloyd y Mc. Cown, 1980) sin reguladores de crecimiento.

Multiplicación: se continuó la evaluación en WPM como medio base y se comparó el efecto de dos reguladores de crecimiento: Topolina (mT) y zeatina(Z). Se evaluaron dos concentraciones de cada regulador de crecimiento Zeatina 2,85 $\mu$ M y 4,27 $\mu$ M meta- Topolinas: 2,12  $\mu$ M y 4,14  $\mu$ M.

El genotipo 82-1 fue introducido en ensayos anteriores, se utilizó como control en los experimentos de la fase de multiplicación.

## Resultados

### Desinfección y fase de iniciación

El porcentaje de contaminación en la introducción de yemas varió entre 15 y 30%. En la etapa de iniciación, se observó una fuerte oxidación y contaminación principalmente en el genotipo 154. Este genotipo no pudo evaluarse en la etapa de multiplicación. En la etapa inicial las variedades 27-1 y 20-2, de plantas provenientes del invernáculo se obtuvieron un alto porcentaje de yemas oscuras y oxidadas. Como muestra la tabla 1, las yemas tomadas de las plantas en invernáculo tuvieron menor respuesta al crecimiento y baja formación de

yemas nuevas (columna 2 y 4). En cambio las yemas que se introdujeron en condiciones de oscuridad, baja luminosidad o etioladas, respondieron regenerando mayor número de yemas (columna 3 y 5). El genotipo 154 no aumentó el número de yemas, se logró introducir una yema que no prosperó en los sucesivos repiques. El genotipo 82-1 fue introducido en ensayos anteriores sin la necesidad de etiolación, además demostró buena respuesta en medios de multiplicación con otros reguladores de crecimiento como bencil adenina, y fue utilizado como control en la evaluación de la topolina

Tabla 1: Respuesta de los genotipos al medio de iniciación, se muestra el efecto de la etiolación de plantas en la introducción in vitro. La columna de la izquierda muestra la fecha y columnas siguientes muestran el número de plantas de cada genotipo en las fechas indicadas.

Fecha	27-1	27-1osc	20-2	20-2osc	154
30/5/2014	7	6	2	4	1
27/6/2014	5	10	3	5	1
17/7/2014	5	10	3	5	1
29/8/2014	8	12	3	3	1
26/9/2014	8	14	2	5	1

### Fase de multiplicación

En la fase de multiplicación, las gráficas 1 y 2 muestran las respuestas a la inclusión de 2 citoquininas diferentes: topolina y zeatina respectivamente. La gráfica 1 muestra cómo se comportaron las yemas en presencia de topolinas en el medio de multiplicación. La topolina no tuvo efecto en aumentar el número de yemas en las concentraciones evaluadas. La mayor concentración (4,14 µM) mejoró la altura de las plantas en algunos casos (dato no mostrado). Como muestra la gráfica 1 en los genotipos 82-1 y 27-1 algunas yemas no proliferaron y se obtuvieron plantas con raíz. Por el contrario, en los medios con zeatina los tres genotipos aumentaron el número de plantas. El genotipo 82-1 mostró el mayor incremento en el número de yemas, luego siguió el genotipo 27-1 y por último se ubicó el genotipo 20-2, con la inclusión de zeatina en los tres casos se obtuvo proliferación de yemas (gráfica 2).

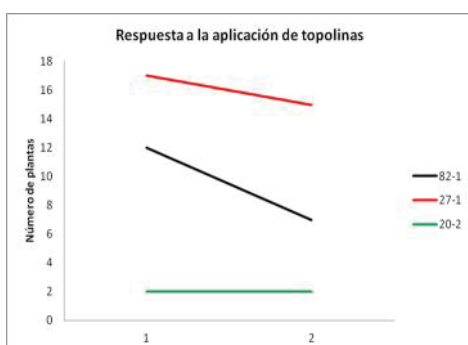


Figura 1: Resultado de la aplicación de topolinas (4,14 µM) en tres genotipos durante dos repiques.

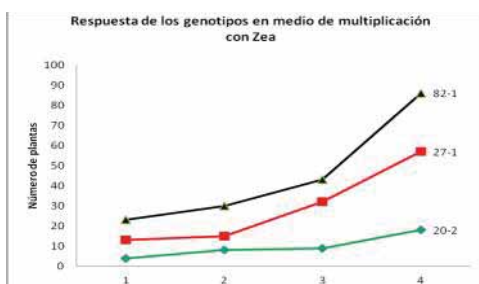


Figura 2: Respuesta a la aplicación de zeatina (4,27 µM) en tres genotipos durante 4 repiques.

## Discusión

Hasta ahora los protocolos utilizados para la multiplicación *in vitro* de guayabo, se han basado en cultivar segmentos nodales, yema apical y axilar, y microesquejes, en la gran mayoría de los casos, mostrando una baja eficiencia en términos de potencial de regeneración (Guerra et al., 2001). En especies como el guayabo la información sobre protocolos eficientes de micropropagación es escasa. Por lo tanto, la estrategia a seguir se orienta a la manipulación de la composición de reguladores del crecimiento y de la interacción con el pool de receptores presentes en el interior de los tejidos de la planta, de esta forma se genera una aproximación empírica a la optimización del cultivo *in vitro* (Montalbán y Moncaleán. 2011).

La presencia de pelos a nivel de las yemas dificultó la desinfección y esto fue muy evidente en el genotipo 154, que no pudo pasar a las etapas siguientes. La contaminación principalmente de origen fúngico también resultó afectando en forma diferente a los genotipos.

La fase de iniciación y establecimiento *in vitro* se caracterizó por un alto porcentaje de explantes oscurecidos; el porcentaje de oscurecimiento fue la consecuencia de la oxidación de compuestos fenólicos presentes en los tejidos del explante producto de la reacción de enzimas como las polifenol oxidasas que inducen la producción de exudados oscuros en el medio de cultivo (Ramírez y Salazar, 1997). Esta oxidación también es características en otras especies de la familia de las mirtáceas como el eucaliptus. El etiolado de las plantas madres, fue importante para superar esta dificultad y generar plantines en forma rápida en la primera etapa de la micropropagación.

En la etapa de multiplicación se evaluaron dos citoquininas en concentraciones equimolares para establecer la comparación de efectividad de cada una de ellas. Las citoquininas son reguladores de crecimiento que juegan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La más ampliamente utilizada en micropropagación es la bencil adenina debido a su gran efectividad, fácil disponibilidad y bajo costo comparada con otros reguladores de crecimiento de su grupo. Sin embargo presenta algunas dificultades que han sido ampliamente reportadas, entre ellas podemos citar la inducción de vitrificación, escaso enraizamiento en etapas posteriores, y heterogeneidad en el material vegetal obtenido (Bairu et al., 2007). La bencil adenina fue evaluada en ensayos de micropropagación de guayabo, pero se obtuvo aumento en el número de plantas solamente en un genotipo (Ross et al., 2013). En nuestros experimentos se observó diferencia en el comportamiento entre los genotipos utilizados, alcanzando valores importantes de 3 explantes en las tasas de multiplicación.

Las topolinas, especialmente la forma meta-topolina y sus derivados han sido empleados para la fase de iniciación de la micropropagación, su utilización ha permitido optimizar protocolos donde se observó que contrarresta diferentes trastornos fisiológicos en muchas especies inducidos en cultivo *in vitro* de plantas como son la vitrificación y la dificultad para enraizar en algunos casos (Aremu et al., 2012). Desde su aparición vienen siendo investigadas para conocer en profundidad su acción y efectividad en las distintas especies. En guayabo a las concentraciones utilizadas en nuestros ensayos, no fueron efectivas en aumentar el número de yemas, por el contrario aumentaron la altura de las plantas y en algunos casos indujeron el enraizamiento. Estos resultados indican que es necesario progresar en el conocimiento sobre concentraciones efectivas de este grupo de reguladores de crecimiento en guayabo.

## Bibliografía

Aremu O., Bairu M., Doležal K., Jeffrey F. and J. Van Staden. 2012. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 108:1–16.

Bairu W. M. Stirk W., Karel Dolezal K., J. Van Staden. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin?. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 90:15–23.

Ducroquet J., Hickel E., Nodari R. 2000. *Goaiabeira serrana (Feijoa sellowiana)* in: *Serie Frutas Nativas*. Funep (Eds). Jaboticabal SP. 66p.

Finardi C., Mathioni S., Santos K., Ducroquet J., Orth A. Guerra M., and Nodari R., 2002. Caracterização da polinização em goiabeira serrana. *Acca sellowiana*. Anais XV Congresso Brasileiro de Fruticultura. Belém, PA, Brazil 1-5p.

Guerra M., Dal Vesco., Ducroquet J., Nodari R., and M. Dos Reis. 2001. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13:117-128.

Köszegi S., Bereczki C, Balog A., Klára Benedek. 2014. Comparing the Effects of Benzyladenine and meta-Topolin on Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Micropropagation. *Not Sci Biol*, 6(4):422-427.

Montalbán N. and P. Moncaleán. 2011. Testing novel cytokinins for improved *in vitro* adventitious shoots formation and subsequent *ex vitro* performance in *Pinus radiata*. *Forestry* 84:363-373.

Plíhal O., Szüčová L. and P. Galuszka. 2013. N9-substituted aromatic cytokinins with negligible side effects on root development are an emerging tool for *in vitro* culturing. *Plant Signaling & Behavior* 8:6, 24392

Lloyd, G. and B.H. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc.*, 30: 421-427.

Ramírez M y E. Salazar. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Rev. Fac. Agrom. (LUZ)*, 14: 497-506.

Ross S. R. Grasso. 2010. *In Vitro* propagation of Guayabo del país (*Acca sellowiana* (Bert) Burret). *Fruit Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 4 (special issue1) 83-87.

Ross S. Castillo A., Speranza P., Speroni G., Vignale B., y D. Cabrera. 2013. Multiplicación *in vitro* de materiales preseleccionados de guayabo del país, *Acca sellowiana* (BERG.) BURRET. Póster presentado en Congreso Red Bio Mar del Plata. Argentina.

Ruggini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Hort.* 24:123-134.

Sökmen A., Cüce E., and Bektas E. 2013. Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. via lateral-bud culture. *Turk J Agric For*, 37:40-44.