

MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *PLUCHEA CAROLINENSIS* (JACQ.) G. DON (ASTERACEAE).

M. Prede¹, W. Perera², O. Sánchez³ y C.A. Pino⁴.

¹ Instituto de Ecología y Sistemática. Cuba. prede@ecologia.cu

² Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad de Liège. Bélgica. wperera@doct.ulg.ac.be ³osnielsr2003@yahoo.es ⁴ Instituto de Ecología y Sistemática. Cuba. pino@ecologia.cu

RESUMEN

Pluchea carolinensis (Jacq.) G. Don es un taxón atractivo por el notable nivel de actividad antioxidante y estrogénica que expresa. Evaluar la capacidad de multiplicación frente a diferentes citoquininas contribuirá con los ya logrados avances en su micropropagación, como alternativa para su conservación y uso sostenible. A partir de brotes de *P. carolinensis* subcultivados se realizó un nuevo subcultivo en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido, combinado con 6 bencilaminopurina (BAP), 6 furfurilaminopurina (KIN) y zeatina (ZEA), utilizando tres concentraciones diferentes (100 µg/L, 200 µg/L y 300 µg/L). Se induce una multiplicación efectiva y luego de 50 días de cultivo se evidencian diferencias en los estándares de crecimiento vegetativo. Las citoquininas KIN y ZEA estimularon mejor la formación y desarrollo de brotes que los tratamientos que emplearon BAP.

Palabras clave: *Pluchea carolinensis*, multiplicación *in vitro*, citoquininas.

INTRODUCCIÓN

Por tradición popular cubana a la salvia de playa, *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don (Asteraceae), se le atribuyen propiedades medicinales (Roig, 1974). En los últimos años se han realizado estudios de prospección de nuestra Flora en diferentes áreas del territorio nacional (Payo *et al.*, 2008; 2008 a; 2011), a través de los cuáles se han ampliado los reportes etnobotánicos sobre nuevas bondades curativas para el taxón y se ha validado desde el punto de vista fitoquímico, como contenido de principios activos con actividades antioxidante y estrogénica (Perera, 2010). Sus potencialidades medicinales hacen de esta Asteraceae una especie atractiva para la industria Médico-Farmacéutica dadas las posibilidades de contar con un fármaco o un producto, cuyo origen natural y contribución al tratamiento de dolencias con marcada incidencia en la población, podrían potenciar sus expectativas de demanda actual.

El cultivo de tejidos vegetales mediante la Micropropagación, resultaría una herramienta efectiva para la continuación de estudios *in vitro* relacionados con la síntesis de los metabolitos de interés y para la producción masiva de nuevos

individuos *ex situ*, alternativa importante con vistas a la conservación del taxón y su uso sostenible, aún con sus ventajas reproductivas en condiciones naturales. La multiplicación, segunda de las fases de la Micropropagación, es donde se concreta la propagación del material vegetal. En esta fase se inducen eventos de reproducción vegetativa de propágulos (yemas, embrioides, brotes) y órganos de reserva que garantizan un incremento numérico máximo para la posterior regeneración de plántulas.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad de multiplicación vegetativa de *P. carolinensis* frente a diferentes citoquininas, en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plántulas de *P. carolinensis* resultantes de la multiplicación *in vitro*, subcultivadas (número de subcultivo indefinido) previamente en medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) (MS), por períodos de 93, 106 y 112 días de cultivo, constituyeron la fuente del material vegetal de partida. Se removieron las hojas y las raíces. Los tallos fueron seccionados en pequeñas estacas de dimensiones aproximadas entre 1.0 – 1.5 cm, con uno a tres nudos. Las estacas fueron inoculadas, en número entre 5 – 10, en 125 mL de medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido, sin suplementos fitohormonales y combinado con 6 bencilaminopurina (BAP), 6 furfurilaminopurina (KIN) y zeatina (ZEA), para un total de 10 tratamientos (Tabla 1), en frascos Delbard.

Tabla 1. Tratamientos de medios de cultivo empleados para la multiplicación de *P. carolinensis*.

Tratamiento	Composición
MS	MS
BAP-1	MS + BAP (100 µg/L)
BAP-2	MS + BAP (200 µg/L)
BAP-3	MS + BAP (300 µg/L)
KIN-1	MS + KIN (100 µg/L)
KIN-2	MS + KIN (200 µg/L)
KIN-3	MS + KIN (300 µg/L)
ZEA-1	MS + ZEA (100 µg/L)
ZEA-2	MS + ZEA (200 µg/L)
ZEA-3	MS + ZEA (300 µg/L)

En cada tratamiento de medio de cultivo se emplearon dos frascos. Los cultivos fueron mantenidos expuestos a iluminación con luz fluorescente blanca continua, bajo las condiciones ambientales del cuarto de mantenimiento de los cultivos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Vida, en la Universidad de Liège (ULg), Bélgica. El seguimiento se realizó semanalmente y se observó la respuesta inicial de las estacas implantadas y su comportamiento en cuanto al crecimiento vegetativo a través de indicadores como el incremento en la altura, la emisión de hojas y el desarrollo radical.

RESULTADOS

En el transcurso de una y otra semana de cultivo se observaron diferencias en los estándares de crecimiento (Figs. 1, 2 y 3).



a1



a2



a3



b

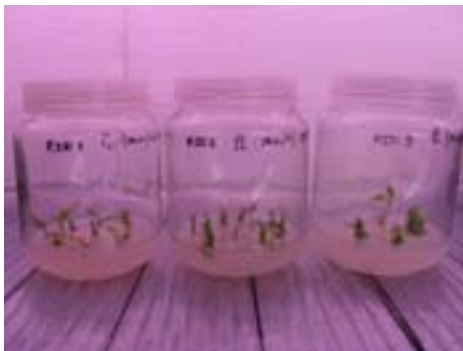
Fig 1. Desarrollo de brotes de *P. carolinensis* luego de una y seis semanas de cultivo en tratamientos ZEA.

a1. Estacas de *P. carolinensis* luego de una semana en ZEA-1.

a2. Estacas de *P. carolinensis* luego de una semana en ZEA-2.

a3. Estacas de *P. carolinensis* luego de una semana en ZEA-3.

a. Plántulas de *P. carolinensis* luego de seis semanas de cultivo en tres concentraciones de ZEA.



a

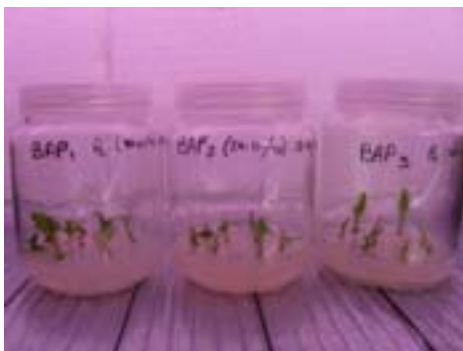


b

Fig 2. Desarrollo de brotes de *P. carolinensis* luego de una y seis semanas de cultivo en tratamientos KIN.

a. Estacas de *P. carolinensis* luego de una semana de cultivo en tres concentraciones de KIN.

b. Plántulas de *P. carolinensis* luego de seis semanas de cultivo en tres concentraciones de KIN.



a



b

- Fig 3. Desarrollo de brotes de *P. carolinensis* luego de una y seis semanas de cultivo en tratamientos BAP.
- Estacas de *P. carolinensis* luego de una semana de cultivo en tres concentraciones de BAP.
 - Plántulas de *P. carolinensis* luego de seis semanas de cultivo en tres concentraciones de BAP.

Desde la primera semana de cultivo comienza a manifestarse una respuesta de crecimiento positiva en todos los tratamientos, con la elongación discreta de las estacas y la activación de las yemas. En los tratamientos en los que se aplicó ZEA se aprecia un mayor número de yemas activas y la emisión de las primeras hojas.

Continúa el desarrollo de los brotes y a partir de la tercera semana de cultivo los tratamientos MS, MS+KIN y MS+ZEA cuentan con un sistema radical establecido y en desarrollo. No así en el tratamiento MS+BAP que manifiesta la emisión de un sistema radical menos prolífero, en la cuarta semana de cultivo. La emergencia y desarrollo del sistema radical condiciona un establecimiento de los brotes (y sus agrupamientos) y posibilita individualizar plántulas completas a partir de ellos.

Durante el primer mes de cultivo y luego de algunas semanas se observa un mejor desarrollo en los tratamientos con Zeatina (ZEA): gran emisión de hojas, hojas grandes, las plantas más altas y el mayor desarrollo radical (Fig. 4). Los tratamientos usando Kinetina (KIN) muestran también un buen desarrollo pero menor con relación a los tratamientos con ZEA. Buena emisión de hojas, que supera el incremento en talla (altura) de las plántulas. El sistema radical bien desarrollado pero menos fuerte y expandido que aquel desarrollado en los tratamientos con ZEA (Fig.4). Con BAP el desarrollo de los órganos vegetativos es inferior. En estos tratamientos aparecen muchas hojas pero pequeñas, las plántulas de menor altura y las raíces con muy poco desarrollo.



Fig. 4. Desarrollo radical en brotes multiplicados de *P. carolinensis* luego de siete semanas de cultivo en los tratamientos ZEA-1 (a) y KIN-1 (b).

Luego de 50 días de cultivo se observan algunos cambios. Los tratamientos con KIN superan a los tratamientos con ZEA en las tres concentraciones, su desarrollo en el número, calidad y tamaño de las hojas; en la altura de las plantas y en el sistema radical es evidente. En los tratamientos con ZEA se afectan los brotes y plántulas, al comenzar a marchitarse (Figs. 5 y 6). En los tratamientos con BAP se aprecia un crecimiento menos favorecido. En BAP-1 se induce desarrollo con mejores

indicadores de crecimiento que en los tratamientos que aplican BAP-3 y BAP-2, en ese orden (Fig. 5 a). BAP induce un incremento en el número de hojas, con relación a la altura de los brotes o plántulas y al desarrollo radical, los mejores indicadores sólo en el tratamiento BAP-1 (Fig.7).

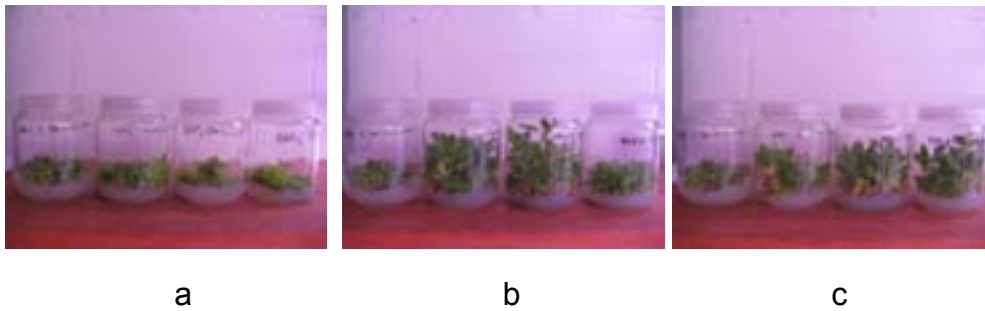


Fig. 5. Desarrollo vegetativo de brotes de *P. carolinensis* luego de siete semanas de cultivo. Comparación entre los tratamientos MS y los de citoquininas a las tres concentraciones.

- a. Tratamientos MS y BAP.
- b. Tratamientos MS y KIN.
- c. Tratamientos MS y ZEA.

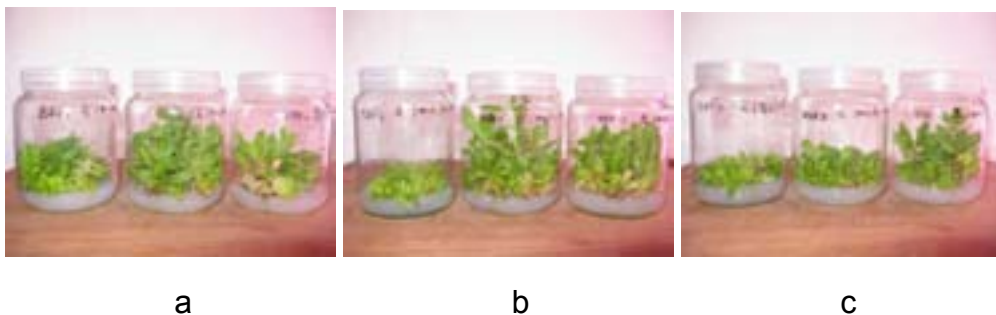


Fig. 6. Comparación en el desarrollo vegetativo de brotes de *P. carolinensis* luego de siete semanas de cultivo con tres citoquininas (BAP, KIN, ZEA) a tres concentraciones diferentes.

- a. Concentración 1 (100 µg/L).
- b. Concentración 2 (200 µg/L).
- c. Concentración 3 (300 µg/L).



Fig. 7. Desarrollo radical en brotes de *P. carolinensis* luego de siete semanas de cultivo en los tratamientos BAP-1 (a) y BAP-3 (b).

El tratamiento MS, sin reguladores de crecimiento, induce también crecimiento, emisión de nuevas hojas (Fig.8) y buen desarrollo radical.



Fig 8. Desarrollo de brotes de *P. carolinensis* cultivados en MS (sin fitohormonas) luego de una (a) y seis semanas (b).

CONSIDERACIONES FINALES

- 1.- *Pluchea carolinensis* mostró una amplia capacidad de multiplicación vegetativa en condiciones *in vitro*, similar a la que sostiene en condiciones naturales.
- 2.- Las citoquininas a las tres concentraciones probadas promovieron una excelente respuesta generativa en *Pluchea carolinensis*.
- 3.- Las citoquininas KIN y ZEA estimularon mejor la formación y desarrollo de brotes a partir de las estacas que los tratamientos que emplearon BAP.

REFERENCIAS

- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Payo, A.L., W. Perera, T. Cordero, R. Sarduy, M. Oquendo, Z. Vázquez, P. Herrera, I. Ventosa, S. Rosete, G. Green, M. Prede, C. Pino y O. Sánchez. 2008. *Prospección de la Flora cubana de interés para la Industria Farmacéutica* (IES - ULg). Informe Final del Proyecto, 60 p. .
- Payo, A.L., M. Prede, S. Rosete, C. Martínez, M.C. Escandón, W. Perera, T. Cordero, C. Pino, M. Oquendo, R. Sarduy, M. Méndez, G. Pineda, D. Navarro, B. Hernandorenas, A. Álvarez, H. Vélez, P. Herrera, A. Menéndez, E. Furrázola, E. Collazo y A. Peix. 2008 a. *Prospección de metabolitos secundarios con actividades estrogénicas y antioxidantes en la flora cubana: su conservación y uso sostenible* (PRDB). Informe Final del Proyecto, 31 p. .
- Payo, A.L., W. Perera, Z. Vázquez, V. Carrera, P. Herrera, I. Ventosa, S. Rosete, G. Green, M. Prede, C. Pino y O. Sánchez. 2011. *Especies de la Flora cubana de interés para la Industria Farmacéutica: extractos con alta capacidad antioxidante* (IES - ULg). Informe Final del Proyecto, 56 p. .
- Perera, W.H., J. Tabart, A. Gómez, A. Sipel, A.L. Payo, C. Kevers y J. Dommès. 2010. Antioxidant capacity of three cuban species of the genus *Pluchea* Cass. (Asteraceae). *Journal of Food Biochemistry* 34: 249–261.
- Roig, J.T. 1974. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. Ciencia y Técnica, Instituto del Libro, La Habana, 708-710.