

Multiplicación *in vitro* de *Morinda royoc* L. en Sistemas de Inmersión Temporal

Elio Jiménez^{1*}, Carlos Reyes², Pablo Machado², Naivy Pérez-Alonso¹, Alina Capote¹, Anabel Pérez¹, Bettina Eichler-Loebermann³

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830

² Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Autopista Nacional km 248. Ranchuelo, Villa Clara, Cuba.

³ Institute of Sustainable Crop Husbandry. Faculty of Agriculture and Environmental Sciences. University of Rostock. Justus-von-Liebig-Weg 6, D-18059 Rostock. Germany.

* Autor para correspondencia: ejimenez@ibp.co.cu

RESUMEN

Morinda royoc L. es una planta medicinal de la cual se han identificado numerosos metabolitos secundarios de importancia para la industria médica y farmacéutica. El empleo de técnicas de cultivo *in vitro* podría contribuir a la producción de estos. El objetivo de este trabajo fue multiplicar *M. royoc* con el uso de SIT. Se emplearon Sistemas de Inmersión Temporal (TIS) de 1000 ml de capacidad. Cada SIT contenía 250 ml de medio de cultivo de multiplicación MS con 4.4 μM de benciladenina (BA) y 2.9 μM de ácido indol acético (AIA). Los SIT fueron inoculados con 30 explantes individuales (ápices y segmentos nodales). Se determinó el efecto de la frecuencia de inmersión (dos, cuatro y seis inmersiones de dos minutos por día) y el tipo de explante (ápices, segmentos nodales) sobre la multiplicación de los brotes y la producción de biomasa. Se comprobó que con cuatro y seis inmersiones por día se obtuvieron los mayores valores de coeficiente de multiplicación y de longitud de los brotes. El máximo valor en la producción de biomasa se alcanzó con seis inmersiones por día. No se observaron síntomas de hiperhidricidad en los brotes. Se observó que los segmentos nodales produjeron más brotes por explante, mayor coeficiente de multiplicación y biomasa que los ápices, mientras que estos últimos dieron lugar a brotes de mayor longitud.

Palabras clave: micropropagación, multiplicación de brotes

ABSTRACT

Morinda royoc L. is a medicinal plant which has identified numerous secondary metabolites important for medical and pharmaceutical industry. The use of *in vitro* culture techniques could contribute to the production of these. The aim of this work was to multiply *M. royoc* using Temporary Immersion System (TIS). It was used TIS of 1000 ml capacity. Each contained 250 ml MS medium with 4.4 μM benzyladenine (BA) and 2.9 μM indole acetic acid (IAA). The SIT were inoculated with 30 individual explants (shoot tips and nodal segments). It was determined the effect of the immersion frequency (two, four and six immersions of two minutes per day) and the type of explants (shoot tips, nodal segments) on the multiplication of shoots and biomass production. It was found that with four and six immersions per day the highest values of multiplication coefficient and shoot length were obtained. The maximum biomass production was achieved with six immersions per day. No hyperhidricity symptoms were observed in shoots. It was noted that the nodal segments produced more shoots per explant, increased multiplication coefficient and biomass than the apex, while the latter resulted in longer shoots.

Keywords: micropropagation, shoots multiplication

INTRODUCCIÓN

Para la producción de productos secundarios de plantas se emplean diferentes órganos y tejidos. Dentro de los

primeros, son considerados generalmente los brotes y las raíces (Baiza *et al.*, 1999). Por ejemplo el cultivo de raíces y específicamente raíces transformadas

muestran un buen crecimiento *in vitro* y producen metabolitos secundarios en cantidades equivalentes, a veces mayor que las producidas por la plantas completas (Boitel- Conti *et al.*, 1995; Vanek *et al.*, 2005). *Morinda royoc* L. es una planta medicinal de la cual se han identificado numerosos metabolitos secundarios de importancia para la industria médica y farmacéutica. El empleo de técnicas de cultivo *in vitro* podría contribuir a la producción de estos.

En este sentido, Capote *et al.* (2008) determinaron el perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos *in vitro* y de plantas de campo de *M. royoc*. Estos autores comprobaron que el cultivo de brotes fue el sistema de cultivo *in vitro* más factible para la producción de biomasa con mayor contenido de materia seca comparado con el cultivo de callos y células. Además, informaron que el rendimiento de los extractos fueron siempre mayores en los sistemas de cultivo *in vitro* en comparación con los obtenidos en plantas en campo.

Por otra parte, Borroto *et al.* (2008) refirieron la producción de antraquinonas mediante el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc*. Más recientemente, Jiménez *et al.* (2011) lograron la propagación de *M. royoc* por organogénesis en medio de cultivo semisólido. Estos estudios sientan las bases para la producción de biomasa *in vitro* y la obtención de metabolitos de interés en estas condiciones.

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) se han empleado para la producción de biomasa de diferentes plantas de interés por sus metabolitos secundarios (Wilken *et al.*, 2005; Quiala *et al.*, 2006).

Por ejemplo, Gontier *et al.* (2005) desarrollaron un sistema de bajo costo para la producción de biomasa de brotes de *Ruta graveolens* y la obtención de furanocoumarinas, basados en la inmersión temporal. Se obtuvo 1.6g de masa seca por día y una productividad de 3.8mg de furanocoumarinas, valores superiores a los que se obtuvieron mediante el cultivo de brotes en agitación y en biorreactores clásicos. Sin embargo, en *M. royoc* no se encontraron referencias sobre el uso de los SIT para la producción de biomasa.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue multiplicar *M. royoc* con el uso de SIT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon plantas *in vitro* de *Morinda royoc* L. en fase de multiplicación propagadas según lo descrito por Jiménez *et al.* (2011).

Para los experimentos fueron utilizados Sistemas de Inmersión Temporal (TIS) de 1000 ml de capacidad, similares a los descritos previamente por Jiménez *et al.* (1999). Cada SIT contenía 250 ml de medio de cultivo de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962) con 4.4 μ M de benciladenina (BA) y 2.9 μ M de ácido indol acético (AIA). Los SIT fueron inoculados con 30 explantes individuales (ápices y segmentos nodales).

Se determinó el efecto de la frecuencia de inmersión (dos, cuatro y seis inmersiones de dos minutos por día) y el tipo de explante (ápices, segmentos nodales) sobre la multiplicación de los brotes y la producción de biomasa. Para ello, se inocularon cuatro SIT por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Los cultivos se colocaron en cámaras de luz solar a $26 \pm 2^\circ$. Después de seis semanas de cultivo se cuantificó el número de brotes por explante y se midió su longitud (cm). Además, la masa fresca (g) producida por SIT fue cuantificada y se calculó el coeficiente de multiplicación como: No. explantes final/ No. explantes inicial.

Los datos cuantitativos (longitud de los brotes, número de brotes y masa fresca) fueron sometidos a análisis de varianza mediante el software SAS® (SAS Institute 2000) y las diferencias estadísticas entre las medias se determinaron por la prueba de Duncan al 5% de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó que con cuatro y seis inmersiones por día se obtuvieron los mayores valores de coeficiente de multiplicación y de longitud de los brotes (Tabla1). El máximo valor en la producción de biomasa (masa fresca/SIT) se alcanzó con seis inmersiones por día. No se observaron síntomas de hiperhidricidad en los brotes.

Tabla 1. Efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación y la producción de biomasa de *M. royoc* en SIT.

Frecuencia de inmersión	Shoot length (cm)	No. brotes/ explante	Coefficiente de multiplicación	Masa fresca/ SIT (g)
2 / día	6.82 b	1.51 a	4.65 b	16.94 c
4 / día	8.53 a	1.83 a	6.0 a	20.72 b
6 /day	9.79 a	1.85 a	5.25 a	28.26 a
Error estándar	0.059	0.21	0.32	1.67

Medias con letras similares en la misma columna no difieren significativamente según la prueba de *Duncan* ($p < 0.05$).

La frecuencia de inmersión influye sobre la morfología, el coeficiente de multiplicación, así como sobre la asimilación de nutrientes y la composición gaseosa de la atmósfera interna en el recipiente de cultivo (Escalona *et al.*, 1999; Etienne y Berthouly, 2002; Quiala *et al.*, 2006). De acuerdo con los resultados el incremento en la frecuencia de inmersión ocasiona un incremento en el crecimiento y en la acumulación de biomasa en *M. royoc*.

Cuando se compararon los dos tipos de explantes se observó que los segmentos nodales produjeron más brotes por explante, mayor coeficiente de multiplicación y biomasa que los ápices, mientras que estos últimos dieron lugar a brotes de mayor longitud (Tabla 2).

Tales diferencias podrían deberse al efecto de la dominancia apical. Usualmente en los

ápices la concentración endógena de auxinas es mayor lo cual induce la elongación de los brotes e inhibe la formación de nuevos brotes.

En la propagación de plantas a gran escala los ápices y segmentos nodales deben ser cultivados de forma separada. Los datos obtenidos demostraron que para la multiplicación y obtención de biomasa de *M. royoc* en SIT los segmentos nodales son más eficientes. Este es el primer informe sobre el empleo de SIT para el cultivo *in vitro* de *M. royoc*.

CONCLUSIONES

Se logró multiplicar *M. royoc* en Sistemas de Inmersión temporal. Se comprobó que tanto la frecuencia de inmersión como el tipo de explante influyen en la multiplicación de los brotes como en la producción de biomasa.

Tabla 2. Efecto del tipo de explante sobre la multiplicación y la producción de biomasa de *M. royoc* en SIT.

Tipo de explante	Longitud de los brotes (cm)	No. de brotes/ explante	Coefficiente de multiplicación	Masa fresca/SIT (g)
Apices	9.62 a	1.4 b	3.5 b	25.9 b
Segmentos nodales	8.41 b	2.67 a	5.40 a	49.7 a
Error estándar	0.14	0.23	1.31	1.58

Medias con letras similares en la misma columna no difieren significativamente según la prueba de *Duncan* ($p < 0.05$).

REFERENCIAS

- Baiza A, Quiz-Moreno A, Ruiz J, Loyola-Vargas V (1999) Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 59: 9-17
- Borroto J, Coll J, Rivas M, Blanco M, Concepción O, Tandron YA, Hernández M, Trujillo R (2008) Anthraquinones from *in vitro* root culture of *Morinda royoc* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 94:181–187
- Capote Alina, Naivy Pérez-Alonso, Anabel Pérez, Raúl Barbón, Enrique Salas, Dirk Wilken, André Gerth, Lutz Müller-Kuhr, Elio Jiménez (2008) Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos *in vitro* y plantas de campo de *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L. y *Morus alba* L. *Biotecnología Vegetal* 8 (1): 119 – 121
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep* 18: 743–748
- Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 215–231
- Jiménez E, Carlos Reyes, Pablo Machado, Naivy Pérez-Alonso, Alina Capote, Anabel Pérez, Bettina Eichler-Loebermann (2011) *In vitro* propagation of the medicinal plant *Morinda royoc* L. *Biotecnología vegetal* 11(1): 43-47
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 5: 473–497
- Quiala E, Barbón R, Jiménez E, de Fera M, Chávez M, Capote A, Pérez N (2006) Biomass production of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42 (3) 298-300
- Wilken D, Jiménez E, Jordan M, Gómez R, Schmeda G, Gerth A (2005) Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. En: Hvoslef-Eide A K and Preil W (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 527-537. Springer, Dordrecht