

## NOTA TÉCNICA

# CULTIVO DE TEJIDOS EN *Ficus carica* CON MINIESTACAS<sup>1</sup>

Dora María Flores-Mora<sup>2</sup>, Vilma Jiménez-Bonilla<sup>2</sup>, Randall Chacón-Cerdas<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas.** Este ensayo se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología, del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, entre los años 2006-2008. Tuvo como objetivo evaluar el cultivo *in vitro* del higo. Para el establecimiento del material vegetal *in vitro* se utilizaron miniestacas de 3 cm, de longitud provenientes de material propagado vegetativamente. Para su desinfección se lavaron y se sumergieron en una solución de 6 g/l de benomilo (50 % i.a.), 6 g/l de sulfato de gentamicina (2 % i.a.) y de clorhidrato de oxitetraciclina (6 % i.a.) y 3,5 g/l de dimetiltiocarbamato (76 % i.a.) durante 90 minutos. Luego se realizó una segunda desinfección con hipoclorito de calcio al 3,5 % p/v durante 10 minutos. Se inocularon en un medio M&S (1962) completo, más 1mg/l de BAP, 300 mg/l de ácido ascórbico y 175 mg/l de ciprofloxacina. En la etapa de multiplicación se separaron los brotes desarrollados, se inocularon y se empleó como medio base M&S (1962) completo, suplementado con 1,0; 0,5 y 0 mg/l de BAP. Para la etapa de enraizamiento, se implementaron dos tratamientos, M&S (1962) completo con 0,5 y 0 mg/l de AIB. Se obtuvo un 31,67 % de supervivencia y asepsia del material en la etapa de introducción y un promedio de tres brotes por explante al mes de incubación. El mayor promedio de brotes por explante se logró en el tratamiento con 1,0 mg/l de BAP y el mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo en el tratamiento sin regulador. Durante la fase de aclimatación, se logró un 100 % de supervivencia.

**Palabras claves:** Higo, micropropagación, cultivo *in vitro*, brotación, benzilaminopurina.

### ABSTRACT

**Tissue culture of fig (*Ficus carica*) with minicuttings.** This investigation took place at the Biotechnology Research Center of the Costa Rica Institute of Technology between the years 2006 and 2008. Its main objective was to implement the *in vitro* production of figs. For the *in-vitro* process, 3-centimeter long ministalks taken from vegetatively propagated material were used. These stalks were washed and immersed in a 6 g/l benomil solution (50 % a.i), 6 g/l gentamicin sulfate (2 % a.i) and oxitetracycline hydrochloride (6 % a.i), and 3.5 g/l dimethyldithiocarbamate (76 % a.i) for 90 minutes. Then, a second disinfection took place with Calcium Hypochlorite at 3,5 % p/v for 10 minutes. The stalks were inoculated in a complete M&S (1962) with 1 mg/l of Ascorbic Acid and 175 mg/l of Ciprofloxacin. During the multiplication stage, the larger shoots were separated and inoculated with three different treatments, using as the basic medium a complete M&S (1962), supplemented with 1.0; 0.5, and 0 mg/l of BAP. For the rooting stage, two different treatments were implemented-- a complete M&S (1962) with 0.5 and 0 mg/l of IBA. 31.67 % of survival and asepsis of the material during the introductory stage and an average of three shoots per explant were achieved after a month of incubation. The highest average of shoots per explant was obtained with the 1.0 mg/l of BAP treatment, and the highest percentage of average roots was achieved with the treatment without a regulator. During the acclimatation stage, we reached 100 % survival.

**Palabras claves:** Fig, micropropagation, *in vitro* culture, bud induction, benzilaminopurine.

<sup>1</sup> Recibido: 10 de diciembre, 2008. Aceptado: 16 de noviembre, 2009. Proyecto de investigación No. 5401-1701-6004 de Vicerrectoría de Investigación y extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. dflores@itcr.ac.cr, vijimenez@itcr.ac.cr; r.e.chac@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

El higo (*F. carica*) tradicionalmente ha sido propagado por acodos aéreos y estacas, en países como España, Turquía, Portugal y Brasil, donde miles de hectáreas son destinadas al cultivo de esta planta (Melgarejo 1999). A pesar de que estos sistemas han demostrado ser eficientes, una de las principales limitaciones es la incapacidad de realizar multiplicaciones masivas en corto tiempo, ya que cada estaca o acodo regenerará una única planta, que en muchos de los casos no cumple con las exigencias del mercado, además para la aplicación de estas técnicas se requiere que las plantas se encuentren en la etapa vegetativa.

Con la aplicación de la técnica de micropropagación de plantas, se amplían las perspectivas de obtención de material vegetal con mejor calidad agronómica y en cualquier época del año (Alberti *et al.* 1992). Para el desarrollo de esta técnica, deben considerarse aspectos fundamentales, como la procedencia, selección y desinfección del explante, así como la composición de los medios de cultivo a utilizar en cada una de las etapas y las condiciones de crecimiento (Navarro y Perea 1996).

Cada sistema de cultivo *in vitro* presenta características particulares que permiten producir plantas completas a partir de explantes. Estas características tienen que ver con el genotipo, el tipo de explante, las normas de asepsia, los medios de cultivo y las condiciones ambientales de incubación. La interacción de estos factores es lo que determina la respuesta del explante al cultivo *in vitro* (Roca y Ramírez 2000). Uno de los mayores usos del cultivo de tejidos es la propagación vegetativa de plantas con el fin de disponer de gran cantidad de material vegetal fitosanitariamente sano (Pasqual y Ferreira 2007).

Estudios realizados por Ferreira *et al.* (2007) en embriogénesis somática de higo usando los reguladores de crecimiento 2,4-D y kinetina, demostraron la factibilidad de esta técnica para la producción de callo y en algunos casos, el inicio de la regeneración de explantes.

La fase de establecimiento *in vitro* tiene como objetivo obtener material axénico y viable para iniciar el proceso de micropropagación, por lo que es indispensable contar con material vegetal pretratado en condiciones de invernadero, ya que el material tomado directamente de campo posee en su superficie una variedad de microorganismos que deben ser reducidos para facilitar los procedimientos de desinfección.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar las diferentes etapas de la micropropagación del higo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización de la investigación

La investigación se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, durante el período 2006-2008.

### Selección del material vegetal y preparación de las estacas

Con el fin de disponer de material vegetal, se seleccionaron 25 estacas con una longitud entre 20 y 25 cm, provenientes de ramas rectas y lignificadas de árboles con más de 25 años de edad, ubicados en la zona de Tierra Blanca en Cartago.

Para favorecer el enraizamiento, la parte basal de las estacas se sumergió en una solución acuosa de Ácido Indol Butírico (AIB) (600 ppm AIB) durante 15 minutos. Posteriormente se plantaron en bolsas de polietileno negras, que contenían un sustrato a base de tierra con carbón vegetal, en una proporción 3:1, y se ubicaron en el invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología, del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en donde se les aplicó riego dos veces por semana y se realizó una fertilización foliar cada 10 días a partir de la brotación. Además se aplicó una solución de benomilo (50 % i.a.) (3 g/l) y de sulfato de gentamicina (2 % i.a.) y de clorhidrato de oxitetraciclina (6 % i.a.) cada ocho días, como pretratamiento, para mantener el material en adecuado estado fitosanitario.

### Establecimiento *in vitro*

#### *Procedencia y selección de los explantes*

Del material ubicado en el invernadero, se colectaron estacas de 8 cm de longitud, poco lignificadas.

#### *Preparación y desinfección de los explantes*

Para el proceso de desinfección de los explantes se utilizó el protocolo base de De Faria (2003). Las

estacas se lavaron con agua y jabón líquido, luego se sumergieron en una solución de 6 g/l de benomilo (50 % i.a.), 6 g/l de sulfato de gentamicina (2 % i.a.) y de clorhidrato de oxitetraciclina (6 % i.a.) y 3,5 g/l de dimetiltiocarbamato (76 % i.a.) por un período de 90 minutos. Posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y una segunda desinfección con hipoclorito de calcio al 4 % (3,5 % i.a.) por un período de 10 minutos en la cámara de flujo laminar. Se realizaron nuevamente tres enjuagues con agua destilada estéril y los explantes se mantuvieron en una solución de ácido ascórbico (600 mg/l), con el fin de evitar la oxidación del material.

En total se realizaron cuatro ensayos de introducción de material para el establecimiento *in vitro*, cada uno con 13, 18, 13 y 16 explantes, respectivamente.

#### *Inoculación del material*

Previo a la inoculación de los explantes, éstos se redujeron a 3 cm de longitud y se eliminó el tejido dañado durante el proceso de desinfección. El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (1962) a la mitad de sales minerales, 30 g/l de azúcar, Bencilaminopurina (BAP) 1 mg/l, ácido ascórbico 300 mg/l, ciprofloxacina 175 mg/l y phytigel 3,5 g/l y de pH 5,7, a una temperatura de 25 °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz, durante un período de doce días. Posteriormente, durante un mes, los explantes se subcultivaron en el medio de inoculación eliminando el antibiótico y el antioxidante, bajo las mismas condiciones de incubación.

Se logró el establecimiento de 48 explantes en total, cada uno inoculado en un frasco de cultivo. Se evaluó el tipo y porcentaje de contaminación presentado, así como el porcentaje de supervivencia del material vegetal.

#### **Etapa de micropropagación**

Para desarrollar la etapa de multiplicación, se utilizaron los brotes obtenidos a partir del material establecido asépticamente. Se realizaron tres ensayos con base en un medio Murashige y Skoog (1962) completo, se adicionó BAP a 1,0, 0,5 y 0 mg/l. La muestra fue de 48 explantes por tratamiento y se mantuvieron las mismas condiciones ambientales empleadas en el establecimiento *in vitro*. Se evaluó el número de brotes promedio por explante a la cuarta semana de cultivo.

#### **Etapa de enraizamiento**

Para evaluar la inducción de raíces, los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación fueron inoculados en un Murashige y Skoog (1962), pero enriquecido con 0 ó 0,5 mg/l de AIB.

La muestra fue de 48 explantes por tratamiento y se mantuvieron las mismas condiciones ambientales que en las etapas anteriores. La evaluación se realizó a las seis semanas de cultivo, anotando el porcentaje de vitroplantas enraizadas.

#### **Endurecimiento y aclimatación de plántulas en invernadero**

Una vez que las vitroplantas presentaron un buen desarrollo radicular fueron trasladadas al invernadero en donde se sembraron en pequeños cilindro de turba prensada en una malla, los cuales se expanden al contacto con el agua y se le aplicó a las plantas un bioestimulante que ayudara a controlar la transpiración. Permanecieron durante una semana en una luminosidad de 1.210,33 lux; una temperatura promedio de 24,20 °C y una humedad relativa promedio de 82,80 %. Luego se cambiaron las condiciones ambientales (1.538,11 lux; 23,40 °C; 72,00 % HR) por otra semana. En esta condición se aplicaron fertilizantes foliares cada cuatro días.

Una vez que las plantas alcanzaron 15 cm de longitud aproximadamente, se transplantaron a bolsas de polietileno negras que contenían un sustrato a base de tierra y trozos de carbón, desinfectado con carboxín (20 % i.a.) y thiram (20 % i.a) (3,5 g/l) y se mantuvieron en las siguientes condiciones: 4.752,33 lux; 22,70 °C; 69,00 % HR. En esta fase se inició un protocolo de fertilización granulada empleando una formulación (10-30-10), con el fin de estimular su crecimiento y desarrollo hasta su traslado a campo.

#### **Análisis estadístico**

Los brotes por explante y el número de plantas enraizadas se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA "One Way". Se empleó el programa estadístico StatSoft Inc. (2004) STATISTICA versión 7.0. Además se realizó un análisis comparativo de las medias de cada muestra con la prueba de Tuckey, considerando un nivel de confianza de 99 % y para el enraizamiento de un 95 %.

## RESULTADOS

### Establecimiento *in vitro*

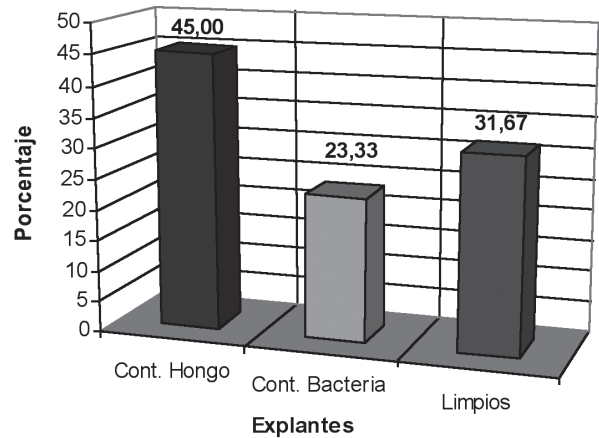
El mayor problema durante el establecimiento *in vitro* del higo fue la contaminación fúngica y bacteriana (Figura 1). El promedio obtenido a partir de las cuatro introducciones mostró un 45 % de contaminación fúngica, 23,33 % contaminación bacteriana y un 31,67 % de explantes limpios.

De los explantes limpios se observó 21,05% de brotación con un promedio de tres brotes por explante al mes de la incubación (Figura 2 A).

### Etapa de micropropagación

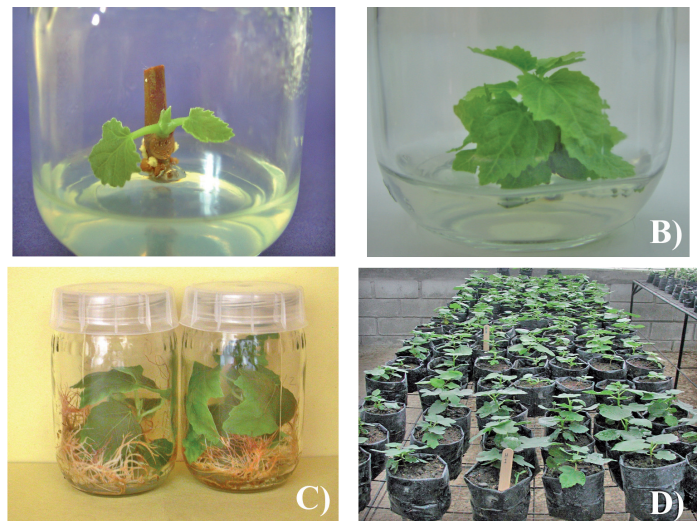
El mayor número de brotes por explante se obtuvo cuando se adicionó al medio de cultivo 1 mg/l de BAP (Figuras 2B y 3). En ausencia del regulador de crecimiento se observó un bajo porcentaje de brotación a la cuarta semana de evaluación, pero una considerable emergencia de raíces al final del periodo (Figuras 2C y 3).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos, con 1 mg/l de BAP se obtuvo un promedio de seis brotes por explante, el

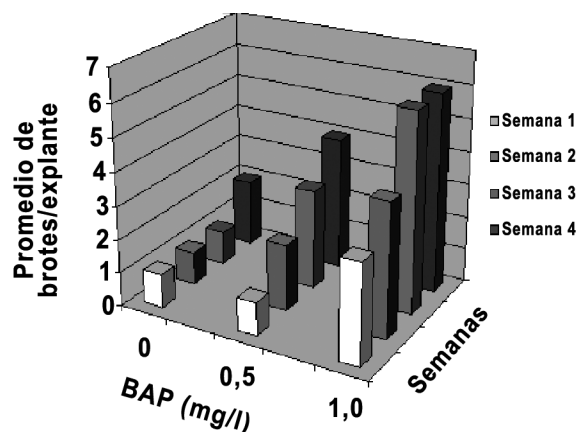


**Figura 1.** Porcentajes de contaminación fúngica, bacteriana y explantes limpios obtenidos a partir de cuatro introducciones. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 2006.

tratamiento con 0,5 mg/l BAP produjo cuatro brotes por explante, y el tratamiento sin regulador presentó dos brotes por explante.



**Figura 2.** *Ficus carica*. A) Microestacas *in vitro*, B) Brotación de microestacas, C) Vitroplantas en la etapa de enraizamiento, D) Vitroplantas aclimatadas. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 2007.



**Figura 3.** Brotes promedio por explante por semana para cada tratamiento. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 2006.

### Enraizamiento *in vitro*

En los ensayos de enraizamiento se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 1). El mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo en ausencia de reguladores del crecimiento (81,24 %), a la cuarta semana de cultivo (Figura 2C).

Para el tratamiento con 0,5 mg/l de AIB se observó la formación de un callo y los porcentajes de enraizamiento fueron inferiores (47,91 %).

Otro aspecto importante de mencionar es que al no utilizarse un regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el porcentaje de enraizamiento no solo fue superior al tratamiento con 0,5 mg/l de AIB, sino que a partir de la cuarta semana se obtuvo el máximo

porcentaje de emergencia radical y de ahí en adelante se mantuvo constante, mientras que al aplicar 0,5 mg/l de AIB la emergencia radical fue menor y el porcentaje máximo se alcanzó hasta la sexta semana.

### Aclimatación en invernadero

En invernadero se obtuvo un 100 % de plantas aclimatadas (Figura 2D), bajo las condiciones que se preestablecieron.

## DISCUSIÓN

El empleo de fungicidas de amplio espectro, mezclado con fungicidas de contacto y bactericidas previo al cultivo *in vitro*, mostraron resultados positivos para el control de un amplio rango de microorganismos y no se observó toxicidad ni daño al material vegetal (Pasqual y Ferreira 2007). Sin embargo, el hipoclorito de calcio se utiliza en el establecimiento *in vitro* por la acción germicida del cloro, ya que forma ácido hipocloroso cuando se mezcla con el agua, el oxígeno liberado en esta reacción es un agente oxidante muy fuerte y los microorganismos son destruidos por su acción sobre los componentes celulares. Además, el cloro puede combinarse con enzimas y otras proteínas de la membrana celular inactivándolas (García 1995). De Faria (2003) recomendó para la desinfección de explantes de higo la utilización de hipoclorito de calcio a concentraciones de 8 y 10 %, sin embargo el autor señala la presencia de un daño considerable después de este tratamiento; por lo que se decidió disminuir la concentración de hipoclorito de calcio en este ensayo.

**Cuadro 1.** Evaluación del porcentaje de enraizamiento de vitroplantas de higo en dos tratamientos durante un período de seis semanas. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 2007.

Tratamiento	% enraizamiento					
E1 (0,5 mg/l AIB *)	0	0	0	16,67	31,24	47,91
E2 (Sin reguladores)	0	16,67	25,0	81,24	81,24	81,24
Semana →	1	2	3	4	5	6

\* AIB: Ácido Indol Butírico.

La aplicación de los reguladores del crecimiento al medio de cultivo va a depender del tipo de diferenciación que se desea obtener. En el higo para la estimulación de las yemas axilares en la etapa de micropropagación se empleó la Benzilaminopurina (BAP). Esta citoquinina, aplicada en bajas concentraciones, promueve no solo la división celular sino la brotación de yemas (Hurtado y Merino 1987). En este estudio se mostró que al agregar al medio de cultivo 1 mg/l de BAP, se obtuvo la mayor cantidad de brotes, sin embargo esta concentración en esta especie fue alta, debido a que se obtuvo una brotación aglomerada lo que impidió realizar una óptima separación de los brotes sin maltratar el tejido, es por esta razón que la concentración de 0,5 mg/l de BAP fue más favorable, ya que a pesar de que se obtuvo un menor número de brotes por explante, éstos se formaron más separados, lo que facilitó su aislamiento sin provocarles ningún daño.

El papel de las auxinas en la iniciación y crecimiento radical es bien conocido (Salisbury y Ross 1994), por lo que se recomienda su empleo en la mayoría de los medios de enraizamiento. En esta investigación la auxina empleada fue el AIB, ya que según Salisbury y Ross (1994), es la más utilizada en la inducción radical. El AIB es activo pese a que se metaboliza con rapidez en AIB-aspartato y al menos otro compuesto conjugado con un péptido. Se sugiere que la formación de un conjugado almacena al AIB y que su liberación gradual mantiene la concentración de este regulador en un nivel adecuado, especialmente en los estadios finales de la formación de la raíz.

Contrario a lo esperado, en esta investigación la emergencia radical de las vitroplantas de higo expuestas a un medio con AIB fue menor comparada con el desarrollo radical obtenido en las vitroplantas expuestas a un medio sin auxina. De acuerdo a Salisbury y Ross (1994) se ha observado que en muchas especies las raíces crecen durante días y semanas *in vitro* sin necesidad de agregar auxina, lo que indica que cualquier necesidad de esta hormona que pueda tener una planta, es suplida por su capacidad de síntesis.

Una de las ventajas de no aplicar ningún regulador del crecimiento al medio de cultivo es la disminución de los costos de producción durante esta etapa.

Las plantas en cultivo *in vitro* se comportan como heterótrofas o mixotróficas, por lo que en la fase de aclimatación son forzadas a ser autotróficas lo que causa un cambio en la morfología de las mismas que

las hace muy susceptibles a varios tipos de estrés (Pospisilova 1999).

Se han observado importantes cambios en la morfología y la anatomía de la hoja después de pasar las vitroplantas al invernadero, sobretodo en el grosor de la hoja, la diferenciación del mesófilo y en el número y estructura de los cloroplastos. Por ejemplo en estudios realizados en *Rubus idaeus*, se observó que el número de tricomas era menor en las plantas *in vitro* al compararlas con las plantas que fueron trasladadas al invernadero. También se observó que en plántulas de *Prunus serotina*, la densidad estomática y la longitud del estoma decrecieron después de que fueron trasladadas al invernadero (Pospisilova 1999). Estas modificaciones en la estructura de las hojas tienen su efecto en las relaciones hídricas y los procesos fotosintéticos de las mismas, lo que influye directamente en la sobrevivencia de las plántulas cuando éstas son trasladadas de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*.

Las vitroplantas de higo tienden a deshidratarse rápidamente, razón por la cual las primeras dos semanas son críticas para lograr la aclimatación. Esta deshidratación estuvo relacionada con el lento desarrollo de la cutícula, de las ceras epicuticulares y la indisponibilidad de un sistema estomático funcional durante el cultivo *in vitro*, lo cual causa altas tasas de transpiración, una vez que las plántulas han sido extraídas de los frascos, para su aclimatación en invernadero (Pospisilova 1999).

## CONCLUSIONES

A pesar de que los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica fueron altos, en el cultivo *in vitro* de *Ficus carica*, se obtuvo un porcentaje de explantes limpios y brotados que permitieron continuar con las siguientes etapas del cultivo *in vitro*.

El protocolo para la multiplicación *in vitro* fue desarrollado exitosamente.

Para la etapa del enraizamiento *in vitro* del higo no se necesitó adicionar auxinas al medio, lo que sugiere la presencia de altos niveles endógenos de auxinas en esta especie.

En la etapa de aclimatación se sugiere mantener altos porcentajes de humedad relativa y baja luminosidad, debido a las altas tasas de transpiración que presentan las vitroplantas de higo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, a CONARE y a los productores por el apoyo financiero y la disponibilidad de material vegetal que brindaron para realizar esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Alberti, GI; Barbosa, SL; Guiorgio, PJ. 1992. La micropropagación: estrategias y posibilidades. Barcelona, España. 315 p.
- De Faria, F. 2003. Validación del protocolo de propagación por estacas y acodos de *Ficus carica* y su establecimiento *in vitro*. Tesis Bach. Cartago, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 46 p.
- Ferreira, E; Pasqual, M; Rezende, J. 2007. 2,4-D and kinetin in callogenesis of *Ficus carica* L. Acta Horticulturae (ISHS) 738:433-436.
- García, V. 1995. Introducción a la microbiología. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. 268 p.
- Hurtado, D; Merino, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. (reimp 2000). México, Trillas. 232 p.
- Melgarejo, P. 1999. El cultivo de la higuera (*Ficus carica* L). Madrid, España. A. Madrid Vicente, ediciones. 100 p.
- Murashige, T; y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15:473-497.
- Navarro, W; Perea, M. 1996. Técnica *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. Heredia, CR. Editorial de la Universidad Nacional. 105 p.
- Pasqual, M; Ferreira, ED. 2007. Protocols for micropropagation of wood trees and fruits, Chapter 37. Micropropagation of fig tree (*Ficus carica*). S.M. Jain; H. Häggman. eds. Brazil. 409-416.
- Pospíšilová, J; Tichá, I; Kadlecěk, P; Haisel, D; Plzákóvá, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biología Plantarum 42(4):481-497.
- Roca, W; Ramírez, H. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF, Universidad Nacional de Colombia. Vicente Zapata S., Serie Proyecto ÁGORA. Ed D., Cali Colombia. 156 p.
- Salisbury, F; Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. Cap. 17: Hormonas y reguladores del crecimiento. González, V (trad). Grupo editorial Iberoamericana, México. p. 395-411.
- StatSoft, Inc.US. 2004. STATISTICA (Data analyses software system) (Programa de Cómputo) Versión 7.0 (CD-ROM). Tulsa, Oklahoma. 1 disco compacto, 8mm.

