

Laboratório de Micropropagação e Análises Bioquímicas. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

Micropropagación de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. vía organogénesis directa

Charlotte Cesty Borda-Yopez,¹ Erik C. Saenz Tejada¹ y Giuseppina Pace Pereira Lima²

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo estandarizar el protocolo de desinfección de semillas, germinación y obtención de plántulas *in vitro* por medio de callos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Las semillas germinadas de *P. umbellata* fueron inoculadas en diferentes concentraciones y combinaciones de BAP (benzilaminopurina) y NAA (ácido naftalenacético) para estimular la producción de callos. Después de 60 días de cultivo, los callos que contenían algunas brotaciones, fueron llevados para medio de organogénesis (GA3 0,1 mg.L⁻¹, BAP 0,5 mg.L⁻¹) por un período de 40 días, para después ser transferido para medio de desarrollo de las plántulas. Finalmente, las plántulas fueron climatizadas y presentaron buen índice de sobrevivencia.

Palabras claves: *Pothomorphe umbellata*, reguladores vegetales, plantas medicinales.

Una de las familias con gran importancia medicinal y económica en Brasil es la Piperaceae,¹ cuyo principal representante es *Piper nigrum* L. Esta familia posee cerca de 12 géneros, con aproximadamente 1 400 especies, distribuidas en las regiones tropicales.² Uno de los géneros menos conocidos, pero con gran importancia medicinal es *Pothomorphe*, constituido por 2 especies: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. conocido como “caapeba do sul” y *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. “caapeba do norte”. Son muchas las propiedades atribuidas a estas especies; *P. umbellata* es usada como analgésica, vermífuga, antiinflamatoria, colagoga y colerética.^{3,4}

Debido a la presencia de varios principios activos y al gran interés de la industria de alimentos y de cosméticos,⁵ las piperáceas han sido objeto de muchas investigaciones fitoquímicas, principalmente por la presencia de antioxidantes.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es uno de los métodos más rápidos para la producción de plantas. También, el cultivo de tejidos ha demostrado éxito en la producción de enzimas y metabolitos secundarios.⁶ Esta ventaja es debido al hecho de que pueden ser cultivadas en condiciones controladas y por eso no son influenciadas por variaciones estacionales.⁷ Otra ventaja del cultivo *in vitro* es la posibilidad del control de medios de cultivo.

En *Pothomorphe umbellata*, afirman que la micropropagación mediante organogénesis directa a partir de segmentos de hojas es más viable, ya que la obtención de plántulas vía semillas presentan problemas, una vez que las semillas presentan graves problemas con la germinación.⁸

El crecimiento y la morfogénesis de los cultivos de tejidos *in vitro* dependen de factores físicos, bioquímicos e fisiológicos, el ambiente tiene una gran influencia sobre el genotipo, así como la composición del medio en el cual será inoculado.⁹ Los reguladores, estimularán o reprimirán las actividades en las cantidades del explante, llevando a respuestas de crecimiento, diferenciación, alargamiento, multiplicación y enraizamiento.¹⁰ La concentración y la estabilidad de la temperatura del regulador durante la preparación y esterilización del medio de cultivo, influyen en la ocurrencia de estos factores.¹¹

De esta manera, los objetivos de este trabajo fueron establecer un protocolo de germinación *in vitro* de *Pothomorphe umbellata* y adaptar el protocolo de producción de callos y organogénesis de *P. umbellata*, además de verificar la aclimatación de estas plantas.

MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Fueron usadas semillas de *Pothomorphe umbellata* L. obtenidas del Distrito de Adrianópolis -Paraná, Brasil, como fuente de los explantes. Las semillas fueron colectadas de los frutos de la planta y secadas a temperatura ambiente. Después de la colecta, el material fue almacenado a bajas temperaturas hasta el momento de la realización del experimento.

Desinfección de las semillas

Las semillas de *Pothomorphe umbellata* L. fueron embebidas en agua destilada y después de 12 horas fueron desinfectadas superficialmente en cámara de flujo laminar, con alcohol al 70% v/v por 30 segundos y solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% v/v (2% de cloro activo) por 5, 10, 15 y 30 segundos.

Debido al tamaño de las semillas (aproximadamente 1 mm) se desarrolló un sistema de desinfección. Las semillas fueron contadas y colocadas en un recipiente con la solución de hipoclorito de sodio durante el tiempo correspondiente al tratamiento. Esta solución fue filtrada en un embudo con papel filtro y lavada 3 veces con agua destilada. Todos estos pasos fueron realizados con materiales estériles. Finalizada la asepsia, las semillas fueron inoculadas en placa *Petri* conteniendo medio semisólido MS.¹² Las placas fueron incubadas en una sala de crecimiento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 2000 lux y fotoperíodo de 16 h/día, durante 30 días. Fueron realizados 3 repeticiones por tratamiento, con 50 semillas cada uno. En esta etapa fue evaluado el mejor tratamiento para la asepsia en las semillas de *P. umbellata*, de acuerdo con el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (5, 10, 15 y 30 minutos).

Germinación de las semillas

Después de la estandarización de la asepsia de las semillas de *P. umbellata*, fue evaluado el efecto del fotoperíodo sobre la geminación (16 h luz/ 8 h de oscuridad, 24 h luz con una intensidad luminosa de 2000 lux y oscuridad total) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Las semillas fueron incubadas durante 40 días y evaluadas cada 7 días. En esta etapa fue evaluado el número de semillas germinadas (salida de la radícula) en cada fotoperíodo.

Producción de callos

El medio de cultivo para la obtención de callos está constituido por las sales básicas de 12 (MS), 30 g.L⁻¹ de sacarosa comercial, 7 g.L⁻¹ de agar, 1 mg.L⁻¹ de tiamina y reguladores vegetales dependiendo del tratamiento. Fueron establecidos 4 tratamientos, basados en el trabajo de *Pescador R, et al* en *Piper hispidinervium* C. DC. (tabla 1). El pH de los medios fue ajustado a 5,8.

Después de la esterilización de los medios, las semillas anteriormente germinadas *in vitro* fueron inoculadas en cajas de cultivo conteniendo 25 mL de medio de cultivo y almacenadas a 16 h/luz, 200 lux y 25 ± 2°C. Durante esta fase fueron evaluados el diámetro de los callos y la formación de las brotaciones.

Tabla 1. Tratamientos usados para la obtención de callos de *P. umbellata*.

	Tratamientos			
	T0	T1	T2	T3
Sales	MS	MS	MS	MS
Tiamina	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹
Azúcar comercial	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹
Agar	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹
BAP	—	0,5 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹	1,5 mg.L ⁻¹
NAA	—	0,4 mg.L ⁻¹	0,6 mg.L ⁻¹	0,8 mg.L ⁻¹

Diferenciación de las plántulas

Para el crecimiento de las brotaciones, los callos producidos en los tratamientos anteriores, fueron transferidos para el medio propuesto por *Pereira AM* y otros⁸ y estos fueron comparados con el medio MS (control). La composición del medio denominado MS/4 (medio MS12 diluido 4 veces) fue 0,5 mg.L⁻¹ BAP, 0,1 mg.L⁻¹ GA3 y 10 g de azúcar comercial.

Tabla 2. Tratamientos utilizados en los callos de *Pothomorphe umbellata* en la fase de la organogénesis

	Tratamientos	
	Control	T1
Sales	MS	MS/4
Tiamina	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹
Azúcar comercial	30 g.L ⁻¹	10 g.L ⁻¹
Agar	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹
GA3	—	0,1 mg.L ⁻¹
BAP	—	0,5 mg.L ⁻¹

Los callos fueron mantenidos a una temperatura de 25 ± 2°C y 16 h/luz, durante 40 días. En esta etapa fue evaluado el número de plántulas producidas a partir de los callos.

CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS

Las plántulas obtenidas en los tratamientos propuestos fueron transplantadas en el medio básico ¹² con la finalidad de evaluar su desarrollo. Las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente. Fue evaluado el número de plántulas, altura y número de brotaciones en cada uno de los tratamientos.

Aclimatación

La aclimatación de las plántulas de *P. umbellata* fue realizada en un invernadero con 50% de sombra y nebulización 3 veces al día durante 15 minutos. Para el plantío, se utilizaron maceteros de plástico, con un substrato formado por 90% de restos vegetales y 10% de estiércol de aves.

Las plántulas fueron mantenidas en el invernadero durante 30 días, en los primeros 15 días cada plántula fue cubierta con un frasco transparente para protegerla del estrés hídrico sin interferir en la fotosíntesis ni en la humedad relativa. La temperatura media del invernadero varió entre 18 y 25°C.

Todos los datos fueron sometidos al análisis de varianza y las cantidades medias comparadas por el *Test de Tukey* al 5% de probabilidad. Se utilizó el programa estadístico SISVAR.¹³

RESULTADOS

Asepsia y germinación de las semillas

Las semillas de *P. umbellata* presentaron tegumento grueso, lo que pudo dificultar la salida de la radícula en el momento de la germinación. El tratamiento con las semillas sometidas a inmersión en agua destilada por 12 horas, no mostró diferencia en la germinación con relación al tratamiento de las semillas que no fueron embebidas. Las semillas que no fueron embebidas en agua, presentaron un 40% de germinación y las semillas embebidas un 45%.

La desinfección de las semillas fue realizada en asepsia total, para evitar cualquier tipo de contaminación externa. Se observó que las semillas desinfectadas en solución de hipoclorito comercial (2% de cloro activo), a una concentración de 20% por 5 minutos presentaron contaminación de 67% a diferencia de aquellas tratadas por 10, 15 y 30 minutos a igual concentración de hipoclorito. Por este motivo, se aumentó el tiempo de tratamiento de desinfección de las semillas.

Cinco días después de la siembra, se observó la salida de las radículas y después de 7 días la aparición de las primeras hojas. Después de 10 días, se inició la contaminación en el tratamiento de 5 minutos. El crecimiento de estas plántulas presentó un desarrollo normal, pero después de 10 días murieron. No se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el número de semillas germinadas en los tratamientos de 5, 10, 15 y 30 minutos (45%).

Después de 30 días, se observó que el número de semillas germinadas no varió en ninguno de los tratamientos, la diferencia fue observada en las plántulas germinadas. En los tratamientos, 10 y 15 minutos, se observó el mayor número de plántulas (32,5 y 30 plántulas respectivamente). No se observó diferencia significativa entre estos tratamientos ($p < 0,05$).

Tabla 3. Evaluación final de las semillas de *Pothomorphe umbellata* germinadas a los 7 días después de la siembra.

Tratamientos	Semillas germinadas	Plántulas (30 días)
5 minutos	40 a	0
10 minutos	45 a	32,5 a
15 minutos	45 a	30 a
30 minutos	42,5 a	25 b
CV %	5,55 %	13,093 %

Las cantidades medias seguidas de la misma letra en la vertical no difieren significativamente entre sí según el Test de *Tukey* al 5% de probabilidad.

Las semillas germinadas presentaron diferencias cuando fueron sometidas al tratamiento de fotoperíodo. Las plántulas obtenidas a luz continua, mostraron un amarillamiento foliar y poco desarrollo, mientras que las plántulas germinadas a un fotoperíodo de 16 horas luz mostraron mayor tamaño y coloración foliar verde intensa, principalmente a los 30 días. No se encontró diferencia significativa entre las semillas germinadas a luz continua y a 16 h/día ($p < 0,05$) Las semillas germinadas a oscuridad total mostraron bajo porcentaje de germinación.

Tabla 4. Germinación de las semillas de *Pothomorphe umbellata* sometidas a luz, oscuridad total y 16 h/día, 30 días después de la siembra.

Tratamiento	Plántulas
Luz continua	23,88 a
Oscuridad total	9,44 b
16 h luz/8 h	23,66 a
CV%	10,59 %

Las cantidades medias seguidas de la misma letra en la vertical no difieren significativamente entre sí según el *Test de Tukey* al 5% de probabilidad.

PRODUCCIÓN DE CALLOS

Durante la primera evaluación, a los 30 días, se observó que la producción de callos a partir de las plántulas germinadas todavía no estaba muy definida en ninguno de los tratamientos. A los 45 días, plántulas del tratamiento conteniendo 0,5 mg.L⁻¹ de BAP y 0,4 mg.L⁻¹ de NAA (T1) presentaron baja producción de callos en la base de la plántula y ausencia de brotaciones o formación de yemas, pero mostraron formación de plántulas a partir de los callos (6 plántulas/27 callos). Los tratamientos 1,0 mg.L⁻¹ de BAP y 0,6 mg.L⁻¹ de NAA (T2) (11 plántulas/27 callos) y 1,5 mg.L⁻¹ de BAP y 0,8 mg.L⁻¹ de NAA (T3) (8 plántulas/27 callos) presentaron mayor diferenciación celular y no presentaron raíces. En el tratamiento 1,0 mg.L⁻¹ BAP y 0,6 mg.L⁻¹ NAA (T2) se observó mayor número de brotaciones a los 45 días de cultivo

Tabla 5. Producción de plántulas a partir de callos de *Pothomorphe umbellata* a los 45 días.

Tratamiento	Plántulas/callos 45 días	Diámetro de los callos 60 días
T1	6 b	1,425 b
T2	11 a	1,72 a
T3	8 ab	1,463 b
CV %	30,19 %	9,44 %

Las cantidades medias seguidas de la misma letra en la vertical no difieren significativamente entre sí según el *Test de Tukey* al 5% de probabilidad.

Plántulas mantenidas en el tratamiento control mostraron hojas grandes y buen desarrollo de las raíces. A los 60 días, las plantas presentaron en promedio 3,8 brotaciones/planta. Los tratamientos T1 (1,425 cm) y T3 (1,46 cm) no mostraron diferencia significativa en relación con el diámetro de los callos, mientras que el tratamiento T2 (1,72 cm) obtuvo la mayor significación. Se observó una correlación positiva entre el diámetro de los callos y el número de las plántulas formadas. El mejor resultado obtenido por *Pereira AM* y otros⁸ fue NAA 0,5 mg.L⁻¹ y BAP 0,5 mg.L⁻¹, donde se obtuvieron 3,6 yemas/callos.

DIFERENCIACIÓN

Después de la formación de las brotaciones, el material vegetal fue transferido para el medio de alargamiento, tal como fue propuesto por *Pereira AM* y otros⁸ (GA3 y BAP) y para el medio MS.

Los resultados variaron mucho dependiendo del tratamiento. Callos del tratamiento T1, transferidos para el medio MS (T1-MS), tal como se menciona en los resultados anteriores, presentaron el menor número de brotaciones (tabla 6), las cuales fueron desarrolladas después de los primeros 60 días de la transferencia para los medios de diferenciación. El tratamiento T1-MS indujo en un promedio 3,5 plantas/callos. Los tratamientos T2-MS y T2-MS/4 mostraron los mejores resultados (5 plantas/callos y 5,33 plantas/callos, respectivamente), en relación con los otros tratamientos.

En el tratamiento T3-MS, las plantas se desarrollaron más que en el tratamiento T3/MS/4, a pesar de no haber sido observada diferencia significativa en el número de plantas producidas por ambos tratamientos (3,28 plantas/callos y 3,33 plantas/callos, respectivamente). Cabe resaltar que el promedio de las alturas de las plántulas producidas fueron ≥ 1 cm. Todas las plántulas obtenidas presentaron raíces.

Para evitar la vitrificación de las brotaciones, fue disminuida la concentración del medio MS en la cuarta parte y la concentración de la sucrosa en 10%.

Tabla 6. Evaluación de la producción de las plantas de *Pothomorphe umbellata* producidas después de 100 días de la inducción de los callos

Tratamiento	Plantas
T1 – MS	3,5 b
T2 – MS	5,0 a
T3 – MS	3,28 b

T1 - MS/4	2,6 c
T2 - MS/4	5,33 a
T3 - MS/4	3,33 b
CV%	38,02 %

Las cantidades medias seguidas de la misma letra en la vertical no difieren significativamente entre sí según el *Test de Tukey* al 5% de probabilidad.

Aclimatación

El primer día de la aclimatación, fueron realizadas evaluaciones biométricas de la altura de la planta (de la base del tallo hasta la yema apical), número de hojas y diámetro de las plantas. Estas plantas fueron clasificadas en pequeñas, medianas y grandes (tabla 7).

Una de las etapas más importantes para una buena aclimatación son los pasos previos al trasplante. Inmediatamente después de abrir los frascos de vidrio, las plántulas fueron sumergidas en agua para evitar la deshidratación. En esta fase, fueron retirados delicadamente los restos de medio de cultivo, sin perjudicar las raíces.

Tabla 7. Evaluación del número de hojas, diámetro y de la altura en plántulas de *Pothomorphe umbellata* después de 30 días de la aclimatación.

	Altura (cm)	Hojas (cm)	Diámetro (cm)
Grandes ($\geq 4,1$)	1,2	8	2,4
Medianas (2,1 - 4,0)	0,76	3,2	1,1
Pequeñas (< 2,1)	0,53	3,66	1,3

En pruebas previas, las raíces de *P. umbellata* fueron cortadas, debido a la gran longitud y exceso de ramificación. Después de 7 días, apenas 20% sobrevivió. Las plantas más desarrolladas de *Pothomorphe umbellata* mostraron raíces adventicias. Fueron realizadas otras pruebas para determinar el grado de estrés hídrico en las plantas de *Pothomorphe umbellata*. Para poder mantener la humedad relativa interna, la planta fue cubierta con bolsas plásticas transparentes con pequeños huecos, para que no interfirieran con la incidencia de la luz. Las plantas no resistieron el brusco cambio de humedad y murieron a los 10 días, fue sustituida la bolsa por un frasco transparente.

La primera evaluación fue realizada a los 30 días después del trasplante. Las plantas clasificadas como pequeñas mostraron una altura menor o igual a 2,0 cm, con un promedio entre 2,1 y 4,0 cm. No se observó influencia en relación con la altura entre las plantas pequeñas y medianas, las cuales crecieron 0,55 y 0,76 cm respectivamente; por lo cual las plantas grandes mostraron mayor altura, con un aumento de 1,2 cm.

En relación con el número de hojas, las plantas grandes también presentaron mayor cantidad (aumento de 8 hojas/planta), con gran número de entrenudos. Entre las plantas pequeñas (aumento de 3,2 hojas/planta) y medianas (aumento de 3,6 hojas /planta) no se observaron diferencias.

El diámetro de las hojas fue una característica digna de resaltar entre las plantas. El desarrollo de las hojas fue muy visible entre el inicio del trasplante y las evaluaciones.

En las plantas pequeñas (1,3 cm de crecimiento), medianas (1,1 cm de crecimiento) y grandes (2,4 cm. de crecimiento) se observó una misma característica, mientras que las plantas grandes presentaron mayor diámetro. Debido al tamaño de las hojas fue más fácil identificar la abundancia de los tricomas en la superficie de las hojas, en los tres tratamientos.

DISCUSIÓN

Los problemas observados fueron en relación con la asepsia y con la germinación de las semillas que presentaron tegumento grueso, dificultando la salida de la radícula en el momento de la germinación,⁸ relataron diversos problemas en la germinación de las semillas de *P. umbellata* para la propagación de plántulas y sugieren la micropropagación a partir de segmentos foliares. En este trabajo, a pesar del bajo índice de germinación, hubo éxito en la obtención de plántulas a partir de las semillas *in vitro*.

La contaminación, en el tratamiento con 5 minutos, que hubo durante la germinación fue principalmente bacteriana, esto puede deberse a la manipulación o al poco tiempo de exposición con el desinfectante, mientras que en los tratamientos de 10 y 15 minutos se observó el mayor número de plántulas sanas.

El uso de reguladores vegetales fue eficiente en la producción de callos de *P. umbellata*. Son varias las citocinas y auxinas que pueden actuar sobre la inducción y proliferación de las yemas axilares. El tipo de citocina y su concentración son los actores que más influyen sobre la multiplicación *in vitro*. BAP ha sido muy eficaz para promover la inducción de las brotación adventicias.¹⁴ Entre las auxinas, NAA es el regulador vegetal que ha demostrado mayor concomitancia con el BAP para la proliferación de las yemas y algunas raíces adventicias.⁸ Según estudios realizados, el uso de 6-benziladenina BA y cinetina en *Piper longum* L. promovieron la formación de múltiples brotaciones formadas a partir de los ápices.¹⁵

Los tratamientos con BAP y NAA fueron buenos para la obtención de callos. El mejor resultado obtenido por *Pereira AM* y otros⁹ fue ANA 0,5 mg.L⁻¹ y BAP 0,5 mg.L⁻¹, se obtuvieron 3,6 yemas/callos. Por los resultados de *Pescador R* y otros¹⁶ el mejor tratamiento en plántulas de *Piper hispidinervium* fue NAA 0,8 mg.L⁻¹ con BAP 1,5 mg.L⁻¹, en este tratamiento se observó una asociación en la respuesta morfogénica entre las concentraciones más altas de los reguladores, cuando son comparados con el control. Este mismo resultado fue observado en este trabajo con *P. umbellata*, cuyo mejor tratamiento fue NAA 0,6 mg.L⁻¹ y BAP 1,0 mg.L⁻¹, donde se encontró el mayor número de brotaciones/callos.

Una alta tasa de proliferación usando la combinación BA y cinetina fue obtenida en *Piper barberi* Gamble a partir de explantes nodales¹⁷ los cuales también relatan una alta tasa de multiplicación de esta Piperaceae.

Después de la formación de las brotaciones, el material vegetal fue transferido para el medio de alongamiento. Los resultados variaron mucho dependiendo del tratamiento. El tratamiento T-MS indujo buena relación de plantas/callos, mientras que en la transferencia para el medio sugerido⁸ (T1-MS/4) se obtuvo 2,6 plantas/callos.

En el tratamiento T3-MS, a pesar de no haber diferencia significativa, las plantas se desarrollaron bien con las alturas de aproximadamente 1 cm y este resultado fue obtenido por la acción de la combinación de 1,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,6 mg.L⁻¹ NAA, lo cual se mantuvo en los resultados de los experimentos anteriores. La combinación de ácido giberélico (GA3) y BAP no sólo promueve el alargamiento de las brotaciones, sino también su iniciación, durante la organogénesis directa de *P. umbellata*⁸ a diferencia de este trabajo donde se desarrolló organogénesis indirecta.

Para evitar de la vitrificación de las brotaciones, la concentración de la sucrosa en 10% fue disminuida como se describe en *Bonga J* y otros.¹⁸ Es bueno resaltar que las concentraciones óptimas de los reguladores vegetales pueden cambiar de acuerdo al genotipo de la planta y deben ser determinados dependiendo de la especie (Borda CCY. Efecto de inductores de tuberización y fotoperíodo sobre la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. (trabajo de diploma Licenciatura en Biología. Universidad Federico Villarreal. Lima, Perú; 2000). En general, para aumentar la tasa de multiplicación, las concentraciones de las citocininas deben ser superiores a las de las auxinas, cuando ocurre lo contrario, y la concentración de las auxinas es superior, ocurre la aparición de las raíces.¹⁹

El desarrollo de las brotaciones no necesariamente podría ser inducido por el medio MS.²⁰ En plántulas de *Punica granatum* L. (granado), la adición de citocininas al medio MS fue esencial para inducir la quiebra de la inactividad de las yemas y de la formación de las múltiples brotaciones en los explantes. El medio MS conteniendo 1,0 mg.L⁻¹ de BAP indujo la brotación en 93% de las yemas, en aproximadamente 15 días, a pesar de que en este trabajo las brotaciones pueden estar inducidas en medio MS, y este es un factor dependiente de la especie y genotipo, tal como fue mencionado por *Borda CCY* (Efecto de inductores de tuberización y fotoperíodo sobre la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. (trabajo de diploma Licenciatura en Biología. Universidad Federico Villarreal. Lima, Perú; 2000) y *Arellano E* y otros.¹⁹

Todas las plántulas obtenidas presentaron raíces. *P. umbellata* muestra gran potencial organogénico a partir de las hojas, no sólo por la formación de las brotaciones, sino también de las raíces; los autores afirman que este potencial está directamente relacionado con la presencia de reguladores exógenos en el medio de cultivo.⁸ En este trabajo, la presencia de los reguladores no influyó en la formación de las raíces en las plántulas obtenidas a partir de callos, posiblemente, este hecho puede ser atribuido a la concentración endógena de los reguladores.

Durante la aclimatación, a pesar que existen algunas informaciones en un trabajo⁸ donde los autores transplantaron plántulas de *P. umbellata* para cajas de Styrofoam®, utilizando sustrato Plantimax®, con una humedad de 70%, en este se utilizó otro procedimiento más práctico y barato para estar más al alcance de los investigadores y agricultores.

El sustrato utilizado se mostró bueno para el desarrollo de la planta *P. umbellata*, con una buena capacidad de retención de humedad, permitió un buen drenaje de agua y buena aeración para el sistema radicular. Se debe resaltar la simplicidad y practicidad del sustrato utilizado, el cual fue hecho con restos vegetales en un 90% y estiércol de aves en un 10%. Además, fueron utilizadas botellas de gaseosa (2 L), no sólo utilizada para disminuir los costos, sino también por ser ecológico.

La etapa de trasplante es una etapa crítica, en primer lugar porque la planta pasa por un reducido flujo respiratorio, debido a la baja intensidad de luz y elevada humedad relativa, para un ambiente que demanda un incremento en la tasa de transpiración, quedándose más susceptible al estrés hídrico.¹¹ Segundo, porque la planta pasa de una existencia heterotrófica, que dependía de un suplemento de sucrosa, para un estado autotrófico. Tercero, porque la planta pasa de un ambiente aséptico para otro donde el ataque de microorganismos saprofitos y patogénicos es común y, finalmente, porque la planta pasa de una condición de alta disponibilidad de nutrientes para otra donde necesita incrementar la absorción de sales.

En estudios previos, las raíces de *P. umbellata* fueron cortadas y después de pocos días tuvo pocos sobrevivientes, lo que pudo deberse a la ausencia de los meristemas, perjudicando de esta manera el crecimiento y desarrollo de la planta. Las plantas pasaron de un estado de alta disponibilidad nutricional para una condición autotrófica, lo que habría forzado a la planta a presentar un rápido alongamiento y desarrollo de las raíces, para absorber los nutrientes necesarios,¹¹ si estas no pudiesen desarrollarse, morirían.

Las plantas de *Pothomorphe umbellata* más desarrolladas mostraron muchas raíces adventicias que van desde la base del tallo, hasta aproximadamente los tres últimos entrenudos. Probablemente, fueron estos los motivos por los cuales sobrevivieron el 20% de las plantas, ya que las raíces superiores no fueron afectadas por la poda, y pudieron alongarse en busca de los minerales del sustrato.

Otras pruebas fueron realizadas para determinar el grado de estrés hídrico. Para poder mantener la humedad relativa interna, la planta fue cubierta con bolsas plásticas transparentes con pequeños huecos, para que no interfirieran con la incidencia de la luz. Las plantas no resistieron el brusco cambio de humedad y murieron a los 10 días.

Después de resultados con pruebas realizadas para determinar el grado de estrés hídrico, utilizando bolsas plásticas con pequeños huecos, fue sustituida la bolsa por un frasco transparente, el cual fue colocado individualmente en cada planta. En la etapa *in vitro*, los estomas no son funcionales y responden muy lentamente al estrés hídrico, la capa de cera protectora presente en las hojas es mínima o inexistente, y la conexión entre el sistema vascular del tallo con las raíces adventicias aún es precaria para mantener un flujo respiratorio adecuado. Por lo tanto, con este sistema se mantuvo una alta humedad relativa interna, y fue observado 100% de sobrevivencia con un gran crecimiento foliar.

La primera evaluación a los 30 días después del trasplante, mostró resultados satisfactorios para plantas clasificadas grandes. El número de hojas de las plantas grandes presentaron mayor número, probablemente debido al gran desarrollo en altura, con mayor número de entrenudos. A los 30 días, cada entrenudo presentó una hoja nueva, que a pesar de ser pequeña ya estaba bien definida. La característica más resaltante fue el diámetro de las hojas en las plantas grandes.

Los resultados nos permiten concluir que la mejor desinfección de las semillas fue conseguida con 20 % de hipoclorito comercial por 15 minutos. Las plántulas de *Pothomorphe umbellata* germinadas a 16 h día/8h oscuridad demostraron mayor tamaño y coloración verde intenso en las hojas. La producción de callos de *Pothomorphe umbellata* fue estimulada con el uso de NAA y BAP, y la combinación de 0,6 mg.L⁻¹

de ANA y 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, produjo el mayor número de plántulas, pero con menor altura.

AGRADECIMIENTOS

A FUNDUNESP (Fundación para el Desarrollo de la UNESP para el apoyo financiero a la ciencia).

SUMMARY

Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. via direct organogenesis

The present research was aimed at standardizing the protocol of seed disinfection, seed germination and organogenesis via callus of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. The germinated seeds were inoculated in different concentrations of BAP (benzylamine purine) and NAA (naphthalene acetic acid) in order to stimulate the callus induction. After 60 days of culture, the calluses with some shoots were taken to an organogenesis medium (GA3 0.1 mg.L⁻¹, BAP 0.5 mg.L⁻¹) during 40 days, to be transferred later to a development medium. Finally, the plantules were acclimatized, presenting a good index of survival.

Key words: Pothomorphe umbellata, growth regulators, medicinal plants.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moraes M de. Caracterização Farmacognóstica da Droga e do Extrato Fluido de *Pothomorphe umbellata* L. (Miq). [dissertação]. (Mestrado - Ciências Farmacêuticas/Controle de Qualidade de Drogas e Medicamentos). São Paulo: Universidade de São Paulo;1983.
2. Barroso G. Sistemática de Angiospermae do Brasil. São Paulo: EPU/USP;1988.
3. Le Conde P. A Amazônia Brasileira III. In: Le Conde P, editor. Árvores e Plantas Úteis. Belém: Clássica;1934. p. 130.
4. Di Stasi L, Santos E, Santos C, Hiruma C. Plantas Medicinais na Amazônia. São Paulo:UNESP;1989.
5. Gottlieb O, Koketsu M, Magalhães M, Maia J, Mendes P, Da Rocha A, et al. Essential oils from the Amazon VII. Acta Amazônica.1981;11:143-8.
6. Matsubara K, Shigekazu K, Yoshika T, Morimota T, Fujita Y, Yamada Y. High density culture of *Coptis japonica* cell increase berberine production. Journal of Chemical Technology and Biotechnology.1989;46:61-9.
7. Phillipson V. A matter of some sensitivity. Phytochemistry.1995;38:1319-43.
8. Pereira AM, Bertoni BW, Appezzato-Da-Gloria B, Araujo AR, Januário AH, Lourenço MV, et al. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.2000;60:47-53.
9. George EF. Plant propagation by tissue culture. The technology. Edington: Exegenetics Ltd;1993.
10. Luz JM, Pasqual M, Souza RJ. Cultura de Tecidos e biotecnologia em mandiquinha.-salsa. Informe Agropecuário. 1997;19:18-21.

11. Grattapaglia D, Machado M. Micropropagação. In: Torres A, Caldas L, Buso J, editores. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: CBAB.1998; I. p.183-260.
12. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*.1962;15:473-97.
13. Ferreira DA. Statistical analyses using Sisvar for windows version 4.0. In: 45th Annual Meeting of the Brazilian Region, 2000. RBRAS. Disponível em: <http://www.tibs.org/rbas-451.html>. Amsterdam 2000.
14. Hu CY, Wang PG. Meristem, shoot tips and bud cultures. In: Evans DA, Sharp, WR, Ammirato PV, Yamada J, editors. Handbook of plant cell culture. New York: Mc Millan Pub.1983; I. p.177-227.
15. Soniya EV, Das MR. In vitro micropropagation of *Piper longum*-an important medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.2002;70:325-7.
16. Pescador R, Araujo PS, Maas CH, Rebelo RA, Giotto CR, Wendsbausen RJr, et al. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta Longa. *Biotecnología Ciência & Desenvolvimento*.2000;15:18-23.
17. Anand A, Rao CS. A rapid *in vitro* propagation protocol for *Piper barberi* Gamblea critically endangered plant. *In vitro Cellular and Development Biology Plant*.2000;36:61-4.
18. Bonga J, Adenkas P. Clonal Propagation. In: Bonga J, Adenkas P, editors. *In vitro Cultures of trees*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;1992. p.107-8.
19. Arello E, Pinto J. Propagação *in vitro* de *Kulmeyera coriacea* I. Efeito das diversas concentrações combinadas de BAP e NAA na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*.1992;28:25-31.
20. Naik S, Pattnaik S, Chad P. *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoots proliferation from nodal segments of mature tree. *Scientia Horticulturae*.1999;79:175-83.

Recibido: 3 de mayo de 2007. Aprobado: 31 de agosto de 2007.

Profa. Livre Docente *Giuseppina Pace Pereira Lima*, Laboratório de Micropropagação e Análises Químicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: gpplima@ibb.unesp.br

¹Master, posgraduado de Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Doutor Professora Livre-Docente.