

# Micropropagación de *Actinidia chinensis* Planch. (Kiwi). Optimización del medio de cultivo para la propagación clonal en gran escala

Radice S. y Caso O. H.

## RESUMEN

La micropropagación en escala comercial de kiwi (*Actinidia chinensis* Planch.) cv. Hayward fue posible a partir de la siembra de ápices extraídos de yemas dormidas. El establecimiento y crecimiento del explanto se logró con el cultivo en medio MS (1962), los compuestos orgánicos de Standardi (1983), 20 g. L<sup>-1</sup> sacarosa, sin auxinas y con el agregado de 1 mg. L<sup>-1</sup> de BA y 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. El empleo de ANA determinó la formación de un callo basal y el crecimiento anormal de la yema.

La brotación de las yemas axilares se obtuvo con un medio compuesto por las sales de MS, los componentes orgánicos de Standardi (1983) e idéntica composición de reguladores del crecimiento. En esta forma se obtuvieron 4-5 brotes por explanto cada 30 días, en condiciones de iniciar el enraizamiento. Esto se logró con la reducción al 50% de los macronutrientes de MS, IBA y PPZ, éstos últimos a razón de 1 mg. L<sup>-1</sup>. El porcentaje de enraizamiento llegó al 95% al cabo de 30 días, con la producción de cerca de 1000 plantitas rusticadas.

**Abreviaturas.** ANA: ácido naft-1-ylacético; BA: H-(fenilmetil)-1H-purin-6-amina; GA<sub>3</sub>: ácido giberélico; IBA: ácido 1H-indol-3-butanoico; MS: medio de Murashige-Skoog (1962); PPZ: 1-fenil-3-metil-5-pirazolona; St: medio de Standardi (1983).

**Palabras clave:** *Actinidia chinensis* - micropropagación - kiwi.

## ABSTRACT

Micropropagation of *Actinidia chinensis* Planch. cv Hayward (kiwi) plants was possible by the culture of resting buds excised in August. The initiation of the explant growth and the proliferation of the axillaries was achieved by the use of the MS (1962) salt formulation, organic compounds of Standardi (1983), 20 g. L<sup>-1</sup> sucrose and (mg. L<sup>-1</sup>) 1 BA and 0,1 GA<sub>3</sub>. After 30 days, a 4-5 multiplication rate was obtained.

Root formation was possible when the macronutrient composition of MS was half reduced, with the same sucrose concentration and the addition of IBA and PPZ, both at 1 mg. L<sup>-1</sup>. A rooting percentage of 95 was obtained after 30 days.

The presented protocol resulted in the production of near 1000 hardened plantlets.

S. Radice y O. H. Caso, Centro de Ecofisiología Vegetal.- Serrano 665, 1414 Buenos Aires, Argentina.

## INTRODUCCION

La propagación clonal de plantas por multiplicación in vitro, es decir por micropropagación, tiene una aplicación importante en la producción de individuos de varias especies frutícolas.

En distintos países se han establecido empresas que comercializan anualmente varios millones de plantas (Hammerschlag, 1986) Además de la posibilidad de producir un alto número de individuos en un corto lapso y en espacios limitados, esta técnica presenta otras ventajas entre las que se pueden citar: el mantenimiento de la fidelidad al tipo de la planta dadora del material, la posibilidad de emplear la propagación vegetativa en aquellas especies difíciles de propagar por métodos convencionales, la producción de plantas libres de patógenos, etc (Zimmerman, 1985, 1986, entre otros). En las plantas micropropagadas se suelen presentar distintas características propias de condicionés juveniles: mayor vigor, una más profusa formación de ramas, buena capacidad de enraizamiento (Hackett, 1985, Jones and Hadlow, 1989; Zimmerman, 1986) A pesar de este rejuvenecimiento, distintos autores han observado precocidad en el inicio de la floración y fructificación (Zimmerman, 1986).

El kiwi (*Actinidia chinensis* Planch) es una especie frutícola en la cual la propagación vegetativa se impone por ser una especie dioica, lo que significa la necesidad de establecer la identidad sexual desde el mismo momento en que se inicia una plantación.

Esta propagación vegetativa puede hacerse por injerto sobre pies de la misma especie, por enraizamiento de estacas o por micropropagación (Standardi, 1985).

Si bien en nuestro laboratorio los primeros intentos para micropropagar kiwi se hicieron durante 1982, recién en 1987 fue posible contar con suficiente material como para realizar cultivos con un número de explantos que posibilitaran la evaluación correcta de una técnica de micropropagación aplicable a la producción en gran escala de plantas madres para vivero.

Una multiplicación de estas características, que debe extenderse a lo largo del año, requiere contar con un medio de cultivo que asegure la formación de brotes vigorosos, fáciles de enraizar y fieles al tipo de la planta dadora. Además, deberá contarse con la formación de un buen sistema radical, lo que contribuirá a facilitar una adecuada rusticación y un exitoso pasaje a condiciones de vivero.

En el presente trabajo se describen los resultados de la micropropagación de kiwi del cv Hayward, habiéndose evaluado distintos medios y métodos de cultivo así como la rusticación de las plantitas obtenidas.

## MATERIALES Y METODOS

Los explantos se obtuvieron de ramas de plantas injertadas del cv. Hayward, sexo femenino, de 1 año de edad, que habían sido importadas de Nueva Zelanda. Al momento de la extracción de las ramas, esas plantas llevaban 6 meses de adaptación a las condiciones del N de la provincia de Buenos Aires. Los trozos de ramas, con las yemas dormidas, se mantuvieron en heladera hasta el momento de disección de los ápices.

Para la extracción de los explantos se empleó un microscopio estereoscópico. El material vegetal no fue desinfectado previamente mientras que los instrumentos de disección fueron cuidadosamente esterilizados antes de remover cada pérula. La obtención de cada explanto demoró escasos minutos y su tamaño fue de aproximadamente 1 mm.

Para el establecimiento e iniciación de la brotación de las yemas se comparó el medio descrito por Standardi (1983) con el medio básico MS (Murashige and Skoog, 1962), con el agregado de IBA, BA y GA<sub>3</sub>, en las combinaciones que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Designación de los medios según la concentración de los reguladores de crecimiento empleados. (mg.L<sup>-1</sup>)

Medio	Regulador		
	IBA	BA	GA <sub>3</sub>
A	0	1,0	0,1
B	0,05	1,0	0,1
C	0,1	1,0	0,1
D	0,1	1,0	0

Una vez obtenido el crecimiento de la yema sembrada y formada una roseta de hojas, se buscó la promoción de la brotación y elongación de las yemas axilares, para lo cual se probaron distintos medios de cultivo: St, MS y MSt, éste último formado por las sales de MS y compuestos orgánicos de Standardi, con el agregado de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BA y GA<sub>3</sub>.

Para el enraizamiento se emplearon brotes de 3-4 cm. de altura con 2-3 hojas expandidas. En esta etapa se probaron distintos medios: St, medio de enraizamiento del autor antes citado; StA, el mismo con la adición de 20 g.L<sup>-1</sup> sacarosa; StR, con 8 mg.L<sup>-1</sup> riboflavina; StI, con 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA; StI10, con 10 mg.L<sup>-1</sup> IBA; StIZ, con 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA + 1 mg.L<sup>-1</sup> PPZ, en todos estos casos con el agregado de 20 g.L<sup>-1</sup> sacarosa; sales del medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad, 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y el agregado de 100 mg.L<sup>-1</sup> mio-inositol, 4 mg.L<sup>-1</sup> tiamina, 1 mg.L<sup>-1</sup> de IBA y PPZ, respectivamente (MSIZ). Todos los medios fueron

solidificados con 8 gr. L<sup>-1</sup> de agar. Los brotes cultivados con los medios StI, StI10 y StIZ, al cabo de 10 ó 15 días fueron transferidos al medio StA. También se probó la siembra de brotes en los medios StA y StR luego de un baño de sus bases con una solución acuosa de 100 mg.L<sup>-1</sup> de IBA y de PPZ.

Para la etapa de iniciación el medio de cultivo fue fraccionado en tubos de 120 x 25 mm, a razón de 10 mL/tubo. Para la multiplicación y el enraizamiento se emplearon frascos de 300 mL con 50 mL de medio, donde se colocaron 5 brotes. La esterilización de los medios de cultivo se cumplió en autoclave, durante 15' a 1,3 MPa.

Los subcultivos se hicieron cada 4 semanas y las condiciones de cultivo fueron 23± 1°C y 16 hs. de luz, con una irradiancia de 1,8 W.m<sup>-2</sup> suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca fría.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Uno de los problemas que más afecta la micropropagación de esta especie es la pérdida de los explantos por la oxidación fenólica que se nota en los cultivos (Standardi, 1983). Esto no ocurrió en los nuestros, posiblemente debido a que al no haberse empleado una solución desinfectante al procederse a la escisión de las yemas, no se observaron cultivos con oxidación de los tejidos. El empleo cuidadoso de los instrumen-

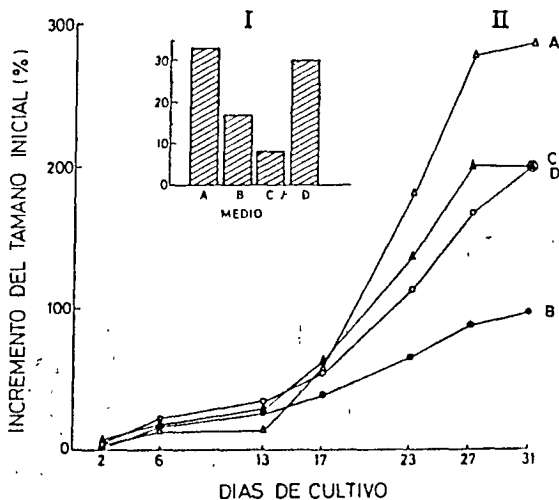
tos de disección permitió obtener una muy baja tasa de contaminación, en ningún caso superior al 20%.

El hecho que para prevenir la formación de fenoles, Standardi and Catalano (1985) debieron alterar el ciclo normal de 24 hs., con alternancias variables de luz/oscuridad durante los primeros 15 días de cultivo, pudo haber influido en el crecimiento de los explantos empleados. La tasa de crecimiento es uno de los parámetros fisiológicos que es afectado por cambios en la duración de los períodos luz/oscuridad (Mansfield and Snaith, 1984).

Cuando en los primeros ensayos se empleó el medio St, descrito por Standardi (1983) para la etapa de iniciación de la brotación de los explantos, se observó un crecimiento anormal del ápice, con frecuente formación de callo. Este medio contiene ANA como auxina. En los experimentos siguientes se reemplazó este regulador por IBA (Tabla 1). Así se logró un crecimiento más normal del explanto, sin callo basal, con hojas normales. Una concentración más baja de IBA (medio B) determinó que aunque el tamaño del explanto al final del período de cultivo fuese menor que con una concentración más alta (medio C), se contara con un porcentaje mayor de aquellos aptos para multiplicación (Fig. 1).

La eliminación de la auxina del medio de cultivo (medio A) no afectó el porcentaje de brotes aptos para la etapa siguiente, como se refleja en la misma figura. Si bien en este medio se registró una demora en el crecimiento inicial del explanto, el mayor tamaño final alcanzado fue consecuencia de una tasa relativa de crecimiento más alta durante los 14 días siguientes. Es posible que el mejor tamaño final de las yemas en un medio sin auxinas fuese debido al mayor tamaño de los explantos empleados, sobre todo cuando se los compara con los usados por Standardi (1,0 mm vs. 0,2-0,5 mm); en consecuencia, las yemas empleadas en estos ensayos poseían un mayor número de primordios foliares en expansión. Es sabido que estos primordios muy jóvenes son fuente de síntesis de auxinas (Schneider and Wightman, 1978). Sin embargo, otra diferencia entre los medios A y D la constituye la presencia de GA<sub>3</sub> en el medio carente de auxinas. Se conoce que las giberelinas pueden actuar sobre la morfogénesis del meristema caulinar cultivado "in vitro" (Morel et Martin, 1968), ya sea por activación de las auxinas endógenas como por la inhibición de oxidasas (Texier et Faucher, 1985). Estos autores encuentran que el agregado de GA<sub>3</sub> es más favorable tanto para la supervivencia como para el alargamiento de los ápices de *Eucalyptus parvifolia* que la combinación de ANA+GA<sub>3</sub>. Esto explicaría los menores crecimientos observados en los cultivos con los medios B y C.

Es decir, que no es imprescindible ningún agregado auxínico al medio de iniciación, en esta forma se



**Figura 1:** Resultados obtenidos después de 30 días de cultivo de yemas de kiwi sembradas en medio MS con distintas combinaciones de IBA, BA y GA<sub>3</sub> expresados como (%). I Brotes aptos para la multiplicación. II Incremento del tamaño inicial.



**Figura 2:** Brote crecido en medio St después de 30 días de cultivo.

logra el crecimiento normal de las yemas, con un adecuado alargamiento de los entrenudos, posiblemente debido a la presencia de la giberelina. Por ello, tanto con auxinas (medio D) como sin este regulador (medio A), un número similar de brotes de un tamaño apropiado para proseguir con la micropropagación pudieron ser transferidos al medio de multiplicación.

El empleo de la composición salina definida por Standardi (1983) para la etapa de multiplicación provocó la formación de brotes ahilados, color verde claro; las hojas tenían forma alargada, con escaso crecimiento de la lámina foliar (Fig. 2). Su reemplazo por las sales del medio MS mejoró sensiblemente la calidad de los mismos, originándose brotes vigorosos, con varios entrenudos, con hojas aovadas, de color verde intenso. Estos cambios no incidieron en la proliferación de las yemas axilares, la que varió entre 4 y 5 por cada explanto sembrado; es decir que la tasa de multiplicación fue similar a la que presenta Standardi (1983).

El empleo del medio para el enraizamiento de los brotes que utiliza este autor (medio St), sin auxinas ni sacarosa, significó la pérdida del material, sin que se formaran raíces. El agregado de sacarosa (medio StA) y de ésta y riboflavina (StR) aunque mejoró la calidad de los brotes, sólo provocó la formación esporádica de



**Figura 3:** Plantitas de kiwi crecidas "in vitro" en medio MSIZ.

raíces (10-20% de los brotes). Es posible que la falta de una respuesta cuando se utilizó el medio St, se deba al empleo de distintas fuentes de iluminación a las empleadas por Standardi y a una menor irradiancia de luz en nuestro cuarto de cultivo. Solamente el crecimiento autotrófico de los cultivos posibilitaría su crecimiento en un medio sin el agregado de sacarosa.

Cuando para el enraizamiento de los brotes, al medio StA se le agregó IBA (medios StI y StI10) se logró la iniciación de raíces en un cierto número de ellos (Tabla 2). Sin embargo, no pudo evitarse la formación de callo basal, que fue mayor en la concentración más alta de IBA. Las raíces formadas eran escasas, sin que en las primarias se originaran raíces secundarias. Como esas raíces se formaban, mayormente, en el callo basal, se perdían en el traspaso a las macetas, lo que significaba la muerte de las plantitas. El agregado de PPZ mejoró tanto el enraizamiento como la calidad de las raíces (ver Tabla 2), alcanzándose valores del 75% de brotes enraizados.



**Figura 4:** Plantas de kiwi rusticadas en terrinas listas para ser transplantadas a macetas.

El tiempo de permanencia en el medio que servía para la inducción de la rizogénesis, previo a la transferencia de los brotes a un medio básico StA, tuvo influencia en la expresión del proceso. Así, hubo inhibición si aquel se prolongó a 15 días (Tabla 2). La mejor respuesta aparente de una mayor permanencia en St10 no se manifestó en un número mayor de individuos, ya que como las raíces se originaban en el callo basal y, por ende, carecían de conexiones vasculares con el brote, generalmente se producía su desprendimiento al iniciarse la rusticación, lo que ocasionaba la muerte de la plantita.

Tabla 2: Porcentaje de brotes enraizados en el medio StA luego de distintos períodos de permanencia en los medios indicados (Los resultados son promedios de 2 experimentos, con 20 brotes en cada uno).

Permanencia	Medios		
	StI	StI10	StI2
10 días	20,0	0	71,5
15 días	0,5	13,5	33,0

El enraizamiento mejoró cuando el medio salino de Standardi se reemplazó por el medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad, y se agregó 1 mg.L<sup>-1</sup> PPZ a la concentración menor de IBA (medio MSIZ). Así se observó que al cabo de 10 días de permanencia en este medio, el 50% de los brotes presentaban primordios radicales, número que se incrementó hasta 92% luego de 15 días y a 95% después de 30 días de cultivo. Otro beneficio que se obtuvo con el empleo de este medio fue que no se hizo necesario un nuevo subcultivo a un medio básico. En esta forma fue posible obtener más de 900 plantitas de las cuales el 75% sobrevivió al trasplante a condiciones de invernáculo.

El empleo de PPZ juntamente con auxinas en el enraizamiento de estacas de varias especies de pinos ha dado resultados satisfactorios (van Buitjnen *et al.*, 1975). En nuestros experimentos, el agregado de PPZ al medio de cultivo para el enraizamiento aumentó el porcentaje de brotes que formaron raíces y, además, impidió la formación de callo basal. Las raíces se formaron en el extremo distal del brote, con un buen número de raíces secundarias (Fig.3). En esta forma, se obtuvieron plantitas que fueron satisfactoriamente trasplantadas a terrinas (Fig. 4) No tenemos una explicación satisfactoria para este efecto de PPZ. Según Donald (1987) se trataría de una auxina sintética. James and Thurbon (1981) encontraron que el compuesto fenólico floroglucinol tenía una acción sinérgica con las auxinas en la promoción del enraiza-

miento de manzano, concluyendo que podía favorecer el mantenimiento de un estado reducido favorable a la iniciación de las raíces, como había postulado Stonier (1972). Si como supone Franclet (1988, com. pers.) PPZ actuaría como anti-oxidante, es posible que el efecto promotor encontrado, esté vinculado a un efecto similar.

El tratamiento de brotes con solución acuosa de IBA + PPZ no pudo ser evaluado en forma cuantitativa, dado el gran número de brotes que se contaminaban al ser sembrados en StA y StR.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, con la producción de cerca de 1000 plantitas rusticadas en condiciones de invernáculo (Radice y Caso, 1991) permiten concluir que es posible realizar la micropropagación en gran escala de plantas de kiwi del cv. Hayward, mediante el empleo de yemas dormidas; que si se toman las suficientes precauciones de asepsia no se requiere desinfección previa del explanto, lo que asegura obtener cultivos sin formación de fenoles y con una baja tasa de contaminación. El empleo del medio salino MS, con los componentes orgánicos de Standardi, sin auxinas pero con 1 mg.L<sup>-1</sup> de BA y 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, permite la iniciación de la brotación y el crecimiento de las yemas axilares. En esta forma se puede obtener una tasa de multiplicación de alrededor de 1:5 cada 30 días. El mismo medio básico con los macronutrientes reducidos al 50% y con el agregado de 1mg L<sup>-1</sup> de IBA y PPZ posibilita la formación de raíces en el 95% de los brotes tratados al cabo de 30 días, sin que se origine callo. En estas condiciones se puede lograr la formación de plantitas, con buenas posibilidades de soportar la rusticación y crecer en condiciones de invernáculo.

## AGRADECIMIENTOS

Por la colaboración técnica de María Mercedes Rivero y María Esther Bressan; igualmente agradecemos el apoyo brindado por el Ing Agr. J.P. Arakelian y por BIOGENETICS S.A.

## BIBLIOGRAFIA

- Donald, D.G.M., 1987. Propagation of pines using cuttings. *So Afric. For. J.*, 140. 16-23.
- Hammerschlag, F.A., 1986. Temperate fruits and nuts, in Zimmerman, R.H., Griesbach, R.J., Hammerschlag, F.A. and Lawson, R.H. (eds.), *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops*, 221-236, Martinus Nijhoff Publ.

- James, D.J. and I J Thurbon, 1981 Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M 9 and the promotive effects of phloroglucinol. *J. Hort. Sci.*, 51 495-499
- Jones, O.P. and W.C.C. Hadlow, 1989 Juvenile-like character of apple trees produced by grafting scions and rootstocks produced by micropropagation. *J. Hort. Sci.*, 64: 396-401.
- Mansfield, T.A. and P.J. Snaith, 1984 Circadian rhythms, in Wilkins, M.B., ed., *Advanced Plant Physiology*. 201-218, Longman Scientific and Technical
- Morel, G et M. Martin, 1968. La culture in vitro du méristème apical dxe pomme de terre. *C.R. Acad. Sci.*, 258.5250-5252.
- Murashige, T. and F.a. Skoog, 1962 Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 437-493.
- Radice, S. y O.H. Caso, 1991 Micropropagación de *Actinidia chinensis* Planch. (Kiwí). Comportamiento en vivero de plantas micropropagadas y su comparación con estacas enraizadas. *Agriscientia*, VIII. 61-65.
- Schneider, E.A. and F. Wightman, 1978 Auxins, in Letham, D.S., Goodwin, P.B. and Higgins, T.J.V. (eds.), *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise*, Vol. I 29-105, Elsevier/North-Holland
- Standardi, A., 1983 La micropropagazione nella moltiplicazione dell' *Actinidia*. *Frutticoltura*, 45(2): 17-22.
- Standardi A. and F. Catalano, 1985. Tissue culture propagation of kiwifruit. *Int. Plant Prop. Soc. Comb. Proceed.*, 34. 236-243.
- Stonier, T., 1972 The role of auxin protectors on autonomous growth. *Coll. Intern. C.N.R.S. No 193, Les Cultures des Tissus Plantes*: 423-436.
- Texier, F. et Faucher, M., 1985 Culture in vitro d'apex d'eucalyptus agé. *Ann. Recher. Sylvic. AFOCEL* 1985: 7-23.
- Van Buitjenen, J.P., J. Toliver, R. Bower and M. Wendel, 1975. Operational rooting of loblolly and slash pine cuttings. *Texas For. Serv., Public.* 111, pp.10.
- Zimmerman, R.H., 1986. Propagation of fruit, nut and vegetable crops Overview, in Zimmerman, R.A. et al., op. cit.: 183-200.
- Zimmerman, R.H., 1985. Tissue culture propagation of woody plants: Large scale production, in Henke, R., Hughes, K.W., Constantin, M.J. and Hollaender, A. (eds.), *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*: 165-177, Plenum Press.