

Propagación *in vitro* del *Callistemon speciosus* L.

In vitro propagation of *Callistemon speciosus* L.

M.J. Pérez de Corcho y M. Daquinta Gradaille*

Laboratorio de Células y Cultivo Tejidos, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, CP: 69450, Cuba. Fax: 53-33 266340.

Resumen

El *Callistemon speciosus* L. es una especie de la familia *Myrtaceae* de gran interés como planta ornamental y medicinal por su alto contenido de aceites esenciales en sus hojas. La reproducción de esta planta es por semilla y por acodos, estos métodos no siempre tienen éxito. Con el objetivo de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de esta especie, se evaluaron 5, 10, y 15 min de desinfección de las semillas con bicloruro de mercurio (HgCl_2) a 0,2% (m/v), cuatro concentraciones de 6-BAP (0; 0,25; 0,50 y 1,0 mg.L^{-1}) para la multiplicación y cuatro niveles (0; 0,5; 1,0, y 1,5 mg.L^{-1}) de AIA para el enraizamiento de los brotes. Se logró 96% de semillas asépticas al desinfectar con bicloruro de mercurio durante 10 min. El medio sin suplementos de citoquininas fue el mejor para la proliferación de brotes. Por otra parte, se logró 100% de enraizamiento de brotes en un medio de cultivo sin suplementos de auxinas. La aclimatización de los brotes se realizó en un sustrato compuesto de zeolita:humus de lombriz (1:1) o humus de lombriz, en condiciones de vivero, con un sistema de riego por microjet. **Palabras clave:** aclimatización, citoquininas, enraizamiento, inducción de brotes, ornamentales.

Abstract

Callistemon speciosus L. is specie of *Myrtaceae* family of great value like ornamental and medicinal plant by higher oil essential content in the leaves. The reproduction is from seed and layers, but these methods do not always exit. With the aim to establish a protocol for *in vitro* propagation of this specie, were evaluated different times of seed disinfections with mercuric chloride (HgCl_2) 0.2% (w/v), several 6-BAP level (0, 0.25, 0.50 and 1.0 mg.L^{-1}) to multiplication and different AIA level to shoots rooting. Disinfection was achieved with mercuric chloride during 10 min. From culture medium evaluated to shoot proliferation, the medium without cytokine supplements was the best. On the other hand, the

Recibido el 18-9-2008 ● Aceptado el 9-3-2011

*Autor de correspondencia e-mail: mdaquinta@bioplantas.cu

shoots rooting were achieved in a culture medium without auxin supplements. Shoots acclimatization of *C. speciosus* L. was made in a substrate composed of zeolite:casting (1:1) or casting, in greenhouse condition, with an irrigation system by microjet.

Key words: acclimatization, cytokines, rooting, ornamentals, shoot induction.

Introducción

Callistemon speciosus DC. [sin: *C. glaucus* (Bonpl.) Sweet] es un arbusto perteneciente a la familia *Myrtaceae*, la cual incluye unas 2800 especies que predominan en los países cálidos; esta familia está constituida principalmente por árboles y arbustos, contienen numerosos y diminutos depósitos de esencias muy aromáticas (Font, 1993). Tiene las ramas pendientes, con hojas lineales-lanceoladas aromáticas y flores rojas, en espigas cilíndricas parecidas a las de los Eucaliptos (Roig, 1965).

Actualmente se describen más de 30 especies de *Callistemon*, todas de origen australiano. Sus hojas contienen aceites esenciales, de los cuales el 1,8-cineol es el componente mayoritario (45 a 80%). Algunas especies de *Callistemon* han sido estudiadas debido a su actividad biológica; una de estas especies es el *C. lanceolatus* Sweet (sin: *C. citrinus*), cuyo extracto etanólico posee actividad insecticida (Mohsen *et al.*, 1990) y sus componentes volátiles poseen actividad fungitóxica sobre patógenos humanos y sobre hongos que afectan tanto a los cultivos de caña de azúcar como a los de arroz (Pandey, 1995; Misra *et al.*, 1997).

El palo basigato (*C. speciosus* L.) como se le conoce en Cuba a esta especie, se propaga por semillas y por aco-

Introduction

Callistemon speciosus DC. [sin: *C. glaucus* (Bonpl.) Sweet] is a shrub that belongs to the family *Myrtaceae*, which includes 2800 species which predominate in warm countries, this family is mainly constituted by trees and shrubs with numerous and small deposits of very aromatic essences (Font, 1993). This shrub has falling branches, with lineal and spike-like leaves aromatic leaves and red flowers, in cylinder spikes similar to eucalyptus (Roig, 1965).

Currently, more than 30 species of *Callistemon* are described, all with Australian origin. Their leaves have essential oils out of which 1.6-cineol is the main component (45 to 80%). Some species of *Callistemon* have been studied due to their biological activity, one of these species is *C. lanceolatus* Sweet (sin: *C. citrinus*), which ethanolic extract has a pesticide activity (Mohse *et al.*, 1990) and their volatile components have fungi-toxic activity on human pathogens and on fungi that affect both the crops of sugar cane and rice (Pandey, 1995; Misra *et al.*, 1997).

C. speciosus L, known as "Palo basigato" in Cuba, propagates by seeds and layers. Layer is a difficult vegetative propagation method and does not always succeed. The great

dos. El acodo es un método de propagación vegetativa difícil y no siempre tiene el éxito deseado. El gran interés de esta especie para su uso en parques, avenidas y jardines, hace necesario la búsqueda de métodos de propagación más rápidos y seguros.

La micropropagación es la técnica de cultivo aséptico de plantas que ha trascendido con mayor éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación práctica. Se define como una multiplicación masiva *in vitro* en la cual las plantas producidas son fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta original de la que se derivan (Krikorian, 1991). El *C. speciosus* como se ha planteado es una especie de alto valor ornamental y medicinal que puede ser multiplicado mediante esta técnica.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *Callistemom speciosus* L., que en el futuro permita la comercialización de esta planta.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la dirección provincial de Comunales; Ciego de Ávila. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1,2 kg.cm⁻² de presión durante 20 min, previo a este proceso el pH del medio se ajustó a 5,7. Para los experimentos se utilizaron frascos de vidrio de 250 mL de capacidad.

Desinfección de las semillas de *C. speciosus* con diferentes tiempos en bicloruro de mercurio.

Se utilizaron semillas de plantas seleccionadas de *C. speciosus*, se procedió a su lavado con detergente anti-

interest of this specie for being used in parks, avenues and gardens makes necessary to research about different propagation methods that be faster and safer.

Micro-propagation is the crop technique of aseptic cultivation with higher success in the area of experiments to the practice. It is defined as a massive multiplication *in vitro*, where plants are produced phenotypically and genotypically identical to the original plant from where they derive (Krikorian, 1991). *C. speciosus*, as has been said, is a specie with a high ornamental and medicinal value that can be multiplied through this technique.

The aim of this research is to establish a protocol for the propagation *in vitro* of *Callistemom speciosus* L., that in the future allows the commercialization of this plant.

Materials and methods

The investigation was developed at the Crop Laboratory of Tissues; Ciego de Ávila. The cultivation media were sterilized in autoclave at 121°C and 1.2 kg.cm⁻² for 20 min, prior to this process, the pH of the media was adjusted to 5.7. For the experiments, glass jars were used of 250 mL of capacity.

Disinfection of seeds of *C. speciosus* with different times in bichloride of mercury

Seeds of plants selected of *C. speciosus* were used, and were proceeded to wash with an special antiseptic chloride detergent Alojén at 3% (v/v) and rinsed with abundant distilled water; in the laminar flow was

séptico clorado Alojén especial al 3% (v/v) y se enjuagaron con abundante agua destilada; en el flujo laminar se realizó la desinfección con bicloruro de mercurio al 0,2% (m/v) durante 5, 10 y 15 min; por último se eliminó el desinfectante a través de tres enjuagues con abundante agua destilada estéril.

Las semillas se sembraron en el medio de cultivo compuesto por sales de MS (1962), 100 mg.L⁻¹ de Mioinositol, 30 g.L⁻¹ de Sacarosa, 0,1 mg.L⁻¹ tiamina y 2,5 g.L⁻¹ de Gelrite. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 25 ± 1°C, un flujo de fotones fotosintéticos de 30-40 μmol m⁻² s⁻¹ y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. A las 72 horas se evaluó el número de semillas contaminadas y se determinó el porcentaje de contaminación.

6-BAP y tipo de explante en el coeficiente de multiplicación de *C. speciosus*

Se utilizaron brotes individuales de 2 a 3 cm de altura provenientes de la fase anterior y se establecieron en el medio de cultivo con 100% de las sales. Los brotes se seccionaron en ápices, nudos y bases y se subcultivaron en los siguientes tratamientos: MS + (0; 0,25; 0,50 y 1,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP). A las seis semanas se evaluó el número de brotes y se calculó el coeficiente de multiplicación.

Concentración de AIA en el enraizamiento de brotes de *C. speciosus*

Se utilizaron brotes individuales de 2 a 3 cm de altura provenientes de fase de multiplicación y se establecieron en el medio de cultivo semi-sólido. Los brotes se subcultivaron en los siguientes tratamientos: MS + (0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg.L⁻¹ de AIA). A las seis se-

done the disinfection with mercury bichloride at 0.2% (m/v) for 5, 10 and 15 min, finally, the disinfectant was eliminated with three rinses and abundant sterile distilled water.

Seeds were sowed in the crop media, composed with salts of MS (1962), 100 mg.L⁻¹ of Myoinositol, 30 g.L⁻¹ of sucrose, 0.1 mg.L⁻¹ thiamine and 2.5 g.L⁻¹ of Gelrite. The crops were incubated at a temperature of 25 ± 1°C, a flow of photosynthetic photons of 30-40 μmol m⁻² s⁻¹ and a photoperiod of 16 hours with light and 8 hours in darkness. Within 72 hours was evaluated the number of contaminated seeds and determined the percentage of contamination.

6 -BAP and type of explant in the multiplication coefficient of *C. speciosus*

Individual buds from 2 to 3 cm of height were used, coming from the prior phase and were established in the crop media with 100% of salts. The buds were selected in apex, knots and bases, and were sub-cropped in the following treatments: MS + (0; 0.25; 0.50 and 1.0 mg.L⁻¹ of 6-BAP). 6 weeks after, were evaluated the numbers of buds and calculated the multiplication coefficient.

Concentration of IAA in the rooting of buds of *C. speciosus*

Individual buds from 2 to 3 cm of height coming from the multiplication phase were used and established in the semi-solid crop media- Buds were sub-cropped in the following treatments: MS + (0; 0.5; 1.0 and 1.5 mg.L⁻¹ of IAA). 6 weeks later, were evaluated the number of rooted buds, the number of roots.buds⁻¹ and the longest root (cm).

manas se evaluó el número de brotes enraizados, el número de raíces brotes¹ y la raíz más larga (cm).

Sustratos en la aclimatización de *C. speciosus*

Los brotes de 1,5 cm o más, obtenidos en el medio de enraizamiento se establecieron en bandejas de 40 cavidades de 82 cm³ de capacidad con los siguientes sustratos:

1. Humus de lombriz (HL)
2. Zeolita + Humus de lombriz (1:1)

Las bandejas se mantuvieron en vivero bajo un sistema de riego microjet, con frecuencia de riego de 15 min., dos veces al día durante 45 días, sin cobertor. La evaluación se efectuó a los 45 días para determinar la supervivencia de las plantas.

En el procesamiento estadístico de los datos se emplearon las pruebas no paramétricas, Anova-Tukey, Kruskal-Wallis, Dunnet's C y Student-Newman-Kuels los cuales se realizaron con el procesador SPSS versión 1.8 para Windows. Para el análisis de los porcentajes, los datos se transformaron según la ecuación $X^1 = (Y+0,5)^{1/2}$. En los experimentos *in vitro* se utilizaron 10 frascos de cultivo (repeticiones) con cinco explantes cada uno, en bloques completamente aleatorizados y en el experimento de aclimatización se emplearon 40 repeticiones por tratamiento en bloques al azar.

Resultados y discusión

Desinfección de semillas de *C. speciosus* con diferentes tiempos en bicloruro de mercurio

Se observó que a medida que se aumentó el tiempo de desinfección con bicloruro de mercurio a 0,2% (m/v), se

Acclimatization substrates of *C. speciosus*

Buds of 1.5 cm or more, obtained in the rooting media were established in trays of 40 cavities of 82 cm³ of capacity with the following substrates:

1. Worm humus (HL)
2. Zeolyte + Worm humus (1:1)

Trays were kept in threshold under an irrigation system microjet, with an irrigation frequency of 15 min, twice a day, for 45 days without any cover. The evaluation was done at day 45 to determine the survival of plants.

In the statistical processing of data, were employed non parametric tests, Anova, Tukey, Kruskal-Wallis, Dunnet's C and Student-Newman-Kuels which were done with the processor SPSS, 1.8, for Windows. For the percentage analysis, the data was transformed with the equation $X^1 = (Y+0.5)^{1/2}$. In the experiments *in vitro* 10 jars of cultivation (replications) were used with five explants each, in completely randomized experimental design, in the acclimatization experiment were employed 40 replications per treatment in blocks at random.

Results and discussion

Disinfection of *C. speciosus* seeds with different times in mercury bichloride

It was observed that at the time that increased the disinfection time with mercury bichloride at 0.2% (m/v) increased the percentage of aseptic seeds (figure 1). With 15 min of disinfection reached 96% of aseptic seeds. Mercury biochloride is a disinfectant very employed in woody species and other

logró aumentar el porcentaje de semillas asépticas (figura 1). Con 15 min de desinfección se alcanzó 96% de semillas asépticas. El bicloruro de mercurio es un desinfectante muy empleado en especies leñosas y otras especies que lo requieran, como son las plantas que se propagan por rizomas cultivadas en el suelo.

Beruto *et al.* (2004) lograron la desinfección de los explantes de *Paeonia suffruticosa* con una solución de bicloruro de mercurio al 0,5% (m/v) durante 3 minutos. En el manejo de la desinfección de los explantes se utilizó el producto concentrado durante poco tiempo como fue el caso reportado por Beruto *et al.* (2004), o el producto menos concentrado con tiempos de exposición mayor de las semillas, como fue empleado por García *et al.* (2010), es

species that would require it, such as plants that propagate by rhizomes cropped in the soil.

Beruto *et al.* (2004) reached the disinfection of explants of *Paeonia suffruticosa* with a solution of mercury biochloride at 0.5% (m/v) for 3 minutes. In the handle of the disinfection of explants, was used the concentrated product for a short period of time, as reported by Beruto *et al.*, (2004), or the less concentrated product with exposure time higher of the seeds, as employed by García *et al.*, (2010), that is, 0.05% for 15 minutes, similar to the employed in the current research. Seeds used were of a plant cropped in a park, which carried to employ exposure times of the disinfectant higher than the mention in the literature under other conditions.

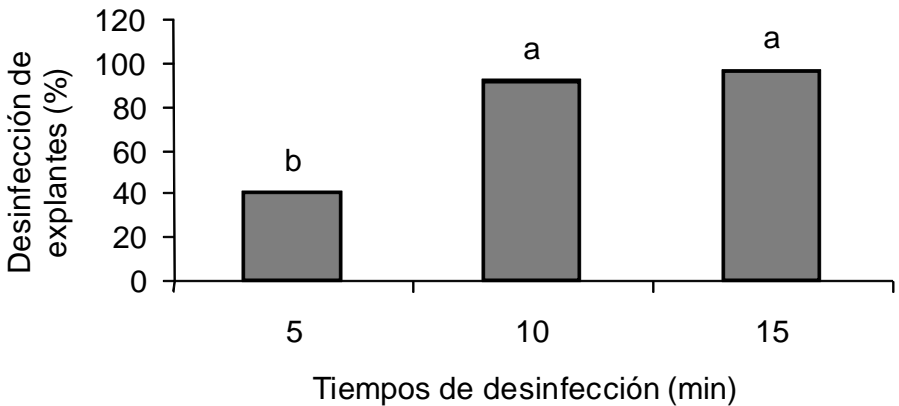


Figura 1. Asepsia de semillas de *Callistemon speciosus* L. con bicloruro de mercurio (0,2%) con diferentes tiempos de desinfección. Medias con letras desiguales difieren entre sí para un valor de $P < 0,05$. (Kruskal-Wallis, Student- Newman- Keuls. ES 0,51).

Figure 1. Asepsis of *Callistemon speciosus* L. seeds with mercury bichloride (0.2%) with different disinfection times. Means with different letter differ among them for a value of $P < 0.05$. (Kruskal-Wallis, Student- Newman- Keuls. ES 0.51).

decir 0.05% durante 15 minutos, similar al que se empleó en el presente trabajo. Las semillas utilizadas fueron de una planta cultivada en un parque, lo cual condujo a emplear tiempos de exposición del desinfectante, mayores a los señalados en la literatura bajo otras condiciones.

Por otra parte, Bhatt y Dhan (2004) lograron la desinfección de los segmentos de brotes de *Myrica esculenta* con bicloruro de mercurio al 0,1% (m/v) durante 10 min, con este tratamiento de desinfección estos autores obtuvieron más de 60% de establecimiento de explantes asépticos. Con similar tratamiento de desinfección Ma y Wu (2006) lograron el establecimiento de semillas inmaduras de *Ochna integerrima*.

Patil y Kuruvinashetti (1998) reportaron la micropropagación de *Eucalyptus tereticomis* a partir de explantes de árboles maduros para lo cual utilizaron bicloruro de mercurio al 0,05% por 15 min, como desinfectante. Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron muy similares a los obtenidos por Rahman *et al.* (2004), quienes lograron desinfectar las yemas de rizomas de plantas de *Curcuma longa* cultivados en campo utilizando 0,1% (m/v) de bicloruro de mercurio durante 14 min. Estos resultados coincidieron con Kanchanapoom y Boonvanno (2000) quienes desinfectaron los ápices de *Maesa ramentacea* con este agente químico durante 10 a 15 min.

6-BAP y tipo de explante en el coeficiente de multiplicación de *C. speciosus*

El efecto de la concentración de 6-BAP empleada y el tipo de explante

On the other hand, Bhatt and Dhan (2004) reached the disinfection in segments of *Myrica esculenta* buds with mercury chloride at 0.1% (m/v) for 10 min, with this disinfection treatment these authors obtained more than 60% of establishment of aseptic explants. With a similar disinfection treatment Ma and Wu (2006) reached the establishment of unripe seeds of *Ochna integerrima*

Patil and Kuruvinashetti (1998) reported the micropropagation of *Eucalyptus tereticomis* after explants of ripened trees, for which they used mercury bichloride at 0.05% for 15 min as a disinfectant. The obtained results in this research were similar to the obtained by Rahman *et al.*, (2004), who made to disinfect the buds of rhizomes of plants of *Curcuma longa* cultivated in the field using 0.1% (m/v) of mercury bichloride for 14 min. These results agreed to those obtained by Kanchanapoom and Boonvanno (2000) who disinfectated the apex of *Maesa ramentacea* with this chemical agent for 10 to 15 min.

6-BAP and type of explants in the multiplication coefficient of *C. speciosus*

The concentration effect of 6-BAP employed and the type of explants in the multiplication coefficient of *C. speciosus* are shown in table 1. At the time that increased the concentration of BAP, reduced the multiplication coefficient independently to the type of explants employed, in the treatments where cytokines was not employed and where were used 0.25 mg.L⁻¹ were obtained the highest multiplication coefficients for apex and knots, with statistical differences among the explants.

en el coeficiente de multiplicación de *C. speciosus* se muestra en el cuadro 1. A medida que aumentó la concentración de BAP disminuyó el coeficiente de multiplicación, independientemente del tipo explante empleado; en los tratamientos donde no se empleó citoquinina y en donde se usaron 0,25 mg.L⁻¹ se lograron los mayores coeficientes de multiplicación para los ápices y nudos, con diferencias estadísticas entre los explantes.

En cuanto a la concentración de 6-BAP, se observó que la adición de esta citoquinina al medio de cultivo de establecimiento no favoreció el porcentaje de brotación de las yemas, ya que el cultivo sin esta citoquinina produjo

Regarding the concentration of 6-BAP, was observed that the addition of this cytokine to the crop media of establishment did not favor the sprouting percentage of buds, since the crop without this cytokine produced the highest percentage of sprouting, excepting the cultivation with 0.25 mg.L⁻¹, which produced a similar sprouting.

6-BAP is a synthetic analogue of natural cytokinins and has a wide use in the crop in vitro, with special emphasis in the micropopagation (George, 1993). This grow regulator has a cytokinine activity thus stimulate the cellular division and the development processes; additionally, in

Cuadro 1. Efecto de la concentración de 6-BAP y el tipo de explante en el coeficiente de multiplicación de *Callistemon speciosus* L.

Table 1. Effect of the 6-BAP concentration and the type of explant in the multiplication coefficient of *Callistemon speciosus* L.

Concentración de 6-BAP (mg.L ⁻¹)	Tipo de explante	Coeficiente de multiplicación
0,00	Ápices	3,86 ± 0,20 ^a
	Nudos	4,43 ± 0,23 ^a
	Bases	1,20 ± 0,15 ^{cd}
0,25	Ápices	3,46 ± 0,26 ^a
	Nudos	3,80 ± 0,15 ^a
	Bases	1,10 ± 0,05 ^d
0,50	Ápices	2,20 ± 0,15 ^{bc}
	Nudos	2,26 ± 0,14 ^b
	Bases	0,90 ± 0,05 ^d
1,00	Ápices	1,56 ± 0,29 ^{bcd}
	Nudos	1,90 ± 0,37 ^{bcd}
	Base	0,96 ± 0,03 ^d

Medias con letras iguales no difieren significativamente. Anova, Tukey, P<0,05, media general del coeficiente de multiplicación= 2,30, ET (error típico) general del coeficiente de multiplicación = 0,17.

el mayor porcentaje de brotación, con excepción del cultivo con $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$, el cual produjo brotación similar.

El 6-BAP es un análogo sintético de las citoquininas naturales y tiene un amplio uso en el cultivo *in vitro*, con especial énfasis en la micropropagación (George, 1993). Este regulador del crecimiento tiene actividad citoquinínica, pues estimula la división celular y los procesos de desarrollo; adicionalmente, en los tejidos tratados promovió la ruptura de la dominancia apical y estimuló el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares (Salisbury y Ross, 1992). Como parte de ese efecto inhibitorio de la dominancia apical, produjo frecuentemente la disminución del tamaño de los brotes (Singh *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2004).

En los ápices, la yema apical se mantuvo en crecimiento activo, de esta forma persistió el dominio de las yemas apicales y se limitó la brotación de yemas laterales. Del mismo modo, fue la dominancia apical la que favoreció el crecimiento de los brotes en este tipo de explante. La brotación de las yemas axilares en el explante de segmentos de nudos, sólo se logró con $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP o sin suplemento de citoquinina.

En trabajos previos con guayabo Enana roja Cubana, se evaluó el efecto de diferentes tipos de citoquininas en la fase de multiplicación de brotes obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro* (Pérez *et al.*, 2002); en este estudio se reconoció al 6-BAP como el regulador del crecimiento de mejores resultados y el más apropiado para la multiplicación *in vitro*. Estos autores también encontraron que los bro-

the treated tissues it promoted the rupture of the apical dominance and stimulated the growth and development of axial buds (Salisbury and Ross, 1992). As part of this inhibitor effect of the apical dominance, it frequently produced the reduction of the size of buds (Singh *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2004).

In apex, the apical bud kept growing actively, in this way persisted the apical buds and sprouting of lateral buds was limited. Likewise, it was the apical dominance the one which favor the growth of buds in this type of explants. Sprouting of axial buds in the segment explants of knots, was only reached with 0.25 mg.L^{-1} of 6-BAP or without any supplement of cytokine

In previous researches with guava Enana roja Cubana, was evaluated the effect of different types of cytokinines in the multiplication phase of buds obtained after seeds germinated *in vitro* (Pérez *et al.*, 2002); in the current research, was recognized 6-BAP was the growth regulator with better results and the most appropriate for the multiplication *in vitro*. These authors also found that sprouts of explants always had higher longitude, independently to the used cytokinine. The origin of such difference to the obtained in *C. speciosus* may be explained by the physiological state of the explants type that was used in this research. Apexes and segments of knots of buds from seeds germinated *in vitro* have an ontogenetic phase much younger than the vegetal material of buds in adult plants. With these results, was obtained a cultivation media favorable to the multiplication *in vitro* of apexes

tes de explantes tuvieron siempre mayor longitud, independientemente de la citoquinina utilizada. El origen de tal diferencia con los obtenidos en *C. speciosus* pudiera estar sustentado por el estado fisiológico del tipo de explante que se utilizó en este trabajo. Los ápices y segmentos de nudos de brotes de semillas germinadas *in vitro*, poseen un estado ontogenético más juvenil que el material vegetal de yemas de plantas adultas.

Con estos resultados se obtuvo un medio de cultivo favorable para la multiplicación *in vitro* de ápices y nudos de plantas obtenidas a partir de *C. speciosus* que permitió obtener hasta 4,4 de coeficiente de multiplicación.

Concentraciones de AIA en el enraizamiento de brotes de *C. speciosus*

Se observó el efecto de los diferentes niveles de AIA en el crecimiento (longitud de los explantes), número de raíces y longitud de la raíz más larga de brotes de *C. speciosus* la longitud obtenida en las plántulas en medio de cultivo sin suplemento de AIA fue mayor y significativamente diferente con respecto a los medios de cultivo donde se adicionó AIA.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticas entre las cuatro concentraciones evaluadas en cuanto a número de raíces, el medio de cultivo sin auxina fue el de mayor número (5,8 raíces por brote). La longitud de la raíz más larga fue mayor en el medio de cultivo sin suplemento de auxina, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos. Por lo antes señalado, se puede plantear que para obtener brotes de mayor altura, más raíces y mayor longitud de la raíz, no

and knots of plants obtained after *C. speciosus* that allowed obtained until 4.4 of multiplication coefficient.

IAA concentrations in the rooting of buds of *C. speciosus*

It was observed the effect of the different levels of IAA in the growth (longitude of explants), number of roots and longitude of the longest root in buds of *C. speciosus*, the longitude obtained in seedlings in the cultivation media without supplement of AIA was higher and significantly different in relation to the cultivation media where AIA was added.

Even though there were not significant differences among the four concentrations evaluated regarding number of roots, the cultivation media without auxin was the one with the highest number (5.8 roots per sprout). The longitude of the longest root was higher in the cultivation media without auxin supplement, with significant differences regarding the other treatments. Because of the latter, it can be said that in order to obtain buds with higher height, more roots and more longitude of roots, it is not necessary the employment of auxins in the cultivation media (table 2).

In guava sprouts "Enana Roja Cubana", obtained after germinated seeds *in vitro*, the media MS without growth regulator obtained a satisfactory *in vitro* rooting (Pérez, 2000): In the current research, with 0.5 mg.L⁻¹ of IAA, were obtained the best results regarding the quality of rooting. This showed that in both treatments was obtained the most appropriate hormonal endogenous balance for the development of adventitious roots in sprouts of *C. speciosus*

es necesario el empleo de auxinas en los medios de cultivo (cuadro 2).

En brotes de guayabo 'Enana Roja Cubana', obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro*, el medio MS sin reguladores del crecimiento obtuvo un enraizamiento *in vitro* satisfactorio (Pérez, 2000). En el presente estudio, con 0,5 mg.L⁻¹ de AIA, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la calidad del enraizamiento. Esto demostró que en ambos tratamientos se logró el balance hormonal endógeno más apropiado para el desarrollo de las raíces adventicias en los brotes de *C. speciosus*.

Con relación a la calidad de los brotes expresada en la longitud de las plantas, con el uso del medio de cultivo sin reguladores del crecimiento se lograron los mejores resultados, al igual que para la calidad de las raíces (longitud) el resultado fue superior aunque sin diferencias estadísticas con el tratamiento de 0,5 mg.L⁻¹ de AIA.

In relation to the quality of sprouts expressed in the longitude of plants, using the cultivation media without growth regulators were achieved the best results, as well as for the quality of roots (longitude) the result was superior though without statistical differences with treatment of 0.5 mg.L⁻¹ of IAA.

The origin of explants, the type of concentration of growth regulators during the induction and proliferation phases of sprouts, as well as the cultivation media, influenced significantly in the requirements of auxins to fulfill the rooting *in vitro* in guava (Ali *et al.*, 2003) and in other woody species (Cantagallo *et al.*, 2005). This aspect explained the high rooting percentage (100%) that was obtained in the current experiment in the cultivation media without auxins. The explants used had its origin after sprouts with young characteristics (sprouts of seeds) and multiplied in a

Cuadro 2. Comportamiento de la altura de los brotes, número de raíces y longitud de las mismas en brotes de *Callistemon speciosus* L.

Table 2. Behavior of height of sprouts, number of roots and longitude of these in sprouts of *Callistemon speciosus* L.

Concentración de AIA (mg · L ⁻¹)	Longitud de brotes ± ET	Número de raíces ± ET	Longitud de la raíz más larga ± ET
0	8,72 ± 0,92 ^a	5,80 ± 0,66 ^a	4,90 ± 0,59 ^a
0,5	6,16 ± 0,64 ^{ab}	5,80 ± 0,37 ^a	3,30 ± 0,51 ^b
1,0	3,80 ± 0,28 ^b	3,80 ± 0,37 ^a	1,10 ± 0,17 ^b
1,5	1,74 ± 0,25 ^c	3,00 ± 0,54 ^a	1,18 ± 0,24 ^b
Media general	5,10	4,60	2,62
ET general	0,52	0,53	0,37

Medias con letras iguales no difieren significativamente (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls), P<0,05). ET= error típico.

El origen de los explantes, el tipo y concentración de reguladores del crecimiento durante las fases de inducción y proliferación de brotes, así como la edad del cultivo, influyeron significativamente en los requerimientos de auxinas para lograr el enraizamiento *in vitro* en el guayabo (Ali *et al.*, 2003) y en otras especies leñosas (Cantagallo *et al.*, 2005). Este aspecto explicó los altos porcentajes de enraizamiento (100%) que se obtuvieron en este experimento en el medio de cultivo sin auxinas. Los explantes utilizados tuvieron un origen a partir de brotes con características muy juveniles (brotes de semillas) y se multiplicaron en un medio de cultivo sin 6-BAP. Sin embargo, para explicar el nivel de enraizamiento en el medio sin reguladores del crecimiento, deben considerarse otros factores; en este caso el balance hormonal endógeno de los brotes de *C. speciosus* fue favorable a las auxinas.

La auxina natural AIA se sintetiza en las hojas jóvenes y ápices en crecimiento, y se transporta basípetamente a través del tallo en tejidos asociados con el sistema vascular, en especial el floema (Marks *et al.*, 2002). De esta forma, los ápices de los brotes de *C. speciosus* fueron capaces de producir suficientes cantidades de AIA que permitieron inducir el desarrollo de las raíces adventicias en un medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento. Un comportamiento similar se observó para el cultivar de guayabo 'Chitidar' (Amin y Jaiswal, 1988) en donde enraizó el 72% de los brotes cultivados en el medio sin auxina.

Haddadi *et al.* (2010), plantean que el medio de cultivo más apropiado

cultivation media without 6-BAP. However, to explain the rooting level in the media without growth regulators, other factors must be considered, in the case the endogenous hormonal balance of sprouts of *C. speciosus* was favorable to auxins.

The natural auxin IAA synthesizes in young leaves and in growing apices, and is transported through the stem in tissues associated to the vascular system, specially the phloem (Marks *et al.*, 2002). Likewise, the apices of sprouts of *C. speciosus* were able to produce enough quantities of AIA that allowed inducing the development of adventitious roots in a cultivation media free of growth regulator. A similar behavior was observe in guava "Chitidar" (Amin and Jaiswal, 1988) where rooted 72% of sprouts cultivated in the media without auxin.

Haddadi *et al.*, (2010) mention that the most appropriate cultivation media to induce the highest percentage of rooted explants, higher number and longitude of roots was MS, supplemented with 0.2 mg.L⁻¹ of NAA or IBA, or without growth regulators, as obtained in this research.

The media without growth regulators is considered the best option, because besides of implying fewer materials in the cultivation media, it guarantees a high rooting level and a better quality of sprouts. At the same time, it is important to mention that the quality indicators of the sprout (height of the sprout, number of roots and longitude of these) are considered important variables in the definition of the cultivation media of rooting, as long as the sprout percentage with roots are not significantly low.

para inducir el mayor porcentaje de explantes enraizados, mayor número y longitud de raíces fue el MS suplementado con 0.2 mg.L^{-1} de ANA o AIB, o sin reguladores del crecimiento, como se logró en el presente trabajo.

El medio sin reguladores del crecimiento se considera la mejor opción, debido a que además de implicar un ahorro de materiales en el medio de cultivo, garantiza un nivel de enraizamiento alto y mejor calidad de los brotes. Al mismo tiempo, es importante señalar que los indicadores de calidad del brote (altura del brote, número de raíces y longitud de estas) se consideran variables importantes en la definición del medio de cultivo de enraizamiento, siempre y cuando el porcentaje de brotes con raíces no sean significativamente bajos.

Sustratos en la aclimatización de brotes *C. speciosus*

Callistemon speciosus es una planta que tiene gran capacidad para enraizar, los brotes provenientes del medio de cultivo de multiplicación MS sin reguladores del crecimiento presentaron varias raíces, lo que permitió realizar la aclimatización de estos, sin la necesidad de subcultivarlo en un medio de cultivo con reguladores del crecimiento del tipo auxínico.

El comportamiento de la supervivencia de los brotes de *C. speciosus* en los dos sustratos evaluados fue similar. El sustrato compuesto por zeolita:humus de lombriz (1:1) se logró 98% de supervivencia de los brotes, teniendo diferencias estadísticas con respecto al humus de lombriz.

Tilkat y Onay (2009) lograron 80% de éxito en la aclimatización de

Substrates in the acclimatization of sprouts *C. speciosus*

Callistemon speciosus is a plant with a great capacity to root, sprouts coming from the multiplication cultivation media MS without growth regulators presented different roots, which allowed doing the acclimatization of these, without subcultivate it in a cultivation media with auxin growth regulator.

The survival behavior of sprouts of *C. speciosus* in the two evaluated substrates was similar. The substrate composed by seolite:worm humus (1:1) obtained 98% of survival of sprouts, with statistical differences in relation to the worm humus.

Tilkat and Onay (2009) obtained 80% of success in the acclimatization of rooted plants of pistachio in a substrate composed by a soil mix, sand and peat (1:1:1), sand fulfills a porosity effect and similar drainage of the zeolyte employed in the present substrate and the rest of the components have a similar role of the worm humus.

The zeolyte mixed has been used with success for the acclimatization of *Solanum tuberosum* (Jiménez *et al.*, 2001); in the current research were obtained the highest survival levels when was employed a zeolyte mix plus worm humus. However, when worm humus was used, the survival of buds was similar. In the wild form of *P. guajava* "Cotorrera", were obtained survival percentages higher than 80% using a sterile mix of soil and cane (1:1) (Rodríguez *et al.*, 2006). Compion and Schiavi (1997) obtained around 90% of survival of *Calathea makoyana*

plantas enraizadas de Pistacho en un sustrato compuesto por una mezcla de suelo, arena y turba (1:1:1), la arena cumple un efecto de porosidad y drenaje similar al de la zeolita empleada en el presente sustrato y el resto de los componentes cumplen un papel similar al humus de lombriz.

La zeolita mezclada ha sido usada con éxito para la aclimatización de *Solanum tuberosum* (Jiménez *et al.*, 2001); en este trabajo se obtuvieron los mayores niveles de supervivencia de los brotes cuando se empleó una mezcla de zeolita más humus de lombriz. Sin embargo, cuando se utilizó sólo el humus de lombriz, la supervivencia de los brotes, fue similar. En la forma silvestre de *P. guajava* 'Cotorrera', se alcanzaron porcentajes de supervivencia superiores al 80%, utilizando una mezcla estéril de suelo y cachaza (1:1) (Rodríguez *et al.*, 2006). Compion y Schiavi (1997) lograron alrededor del 90% de supervivencia de las plantas de *Calathea makoyana*, al realizar la aclimatización en una mezcla de turba:perlita (3:1). Sin embargo, Rahman *et al.* (2004a) lograron solo el 70% de supervivencia de otra planta rizomatosa (*Curcuma longa*) al realizar la aclimatización de los brotes obtenidos *in vitro* bajo condiciones similares a las empleadas en este trabajo.

Por otra parte, Rahman *et al.* (2004b) observaron que el 85% de las plantas de *Kaempferia galanga*, pudieron ser establecidas bajo condiciones *ex vitro* cuando fueron transferidos a macetas conteniendo una mezcla de suelo y abono orgánico.

Las vitroplantas de *Callistemon* sp. en este estudio mostraron un comportamiento favorable en la fase de

plants when doing the acclimatization in a mix of peat:perlite (3:1). However, Rahman *et al.*, (2004a) only obtained 70% of survival of other "rizomatosa" plant (*Curcuma longa*) when doing the acclimatization of the sprouts obtained *in vitro* under similar conditions of the employed in thus research.

On the other hand, Rahman *et al.*, (2004 b) observed that 85% of plants of *Kaempferia galanga*, could have been established under *ex vitro* conditions when were transferred to pots containing a mix of soil and organic manure.

Seedlings of *Callistemon* sp. In the current research, showed a favorable behavior in the acclimatization phase, as long as were conditions of high environmental humidity and good porosity of the substrate: on this matter, in Cuba the acclimatization of rooted seedlings of "guayabita pinar" (*P. salutare* (HBK) Berg) obtained a survival of 75%, suing as substrates mixes of soil and worm humus, protecting it with clear polyethylene and irrigation with micro aspersion every two hours in the mornings (Sotolongo, 2000)

In the cultivar "Enana Roja Cubana", seedlings obtained after the germinated seeds *in vitro*, obtained a survival of 98%, with an acclimatization methodology similar to the one used in the current research (Pérez *et al.*, 2002).

Conclusions

It is possible the multiplication *in vitro* of *Callistemon* after apexes, knots and bases of seedlings obtained from seeds, in the cultivation media

aclimatización, siempre y cuando se tuvieran condiciones de alta humedad ambiental y buena porosidad del sustrato. Al respecto, en Cuba la aclimatización de vitroplantas enraizadas de guayabita del pinar (*P. salutare* (HBK) Berg.) logró una supervivencia del 75%, utilizando como sustratos mezclas de suelo y humus de lombriz, con protección de polietileno transparente y riego con microaspersores cada dos horas durante el período diurno (Sotolongo, 2000).

En el cultivar Enana Roja Cubana, las vitroplantas obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*, tuvieron una supervivencia del 98% con una metodología de aclimatización similar a la utilizada en este trabajo (Pérez *et al.*, 2002).

Conclusiones

Es posible realizar la multiplicación *in vitro* del *Callistemon* a partir de ápices, nudos y bases de las plántulas obtenidas de semillas, en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) sin suplemento de reguladores del crecimiento. Los brotes obtenidos de los diferentes explante se enraizaron en un medio de cultivo MS sin suplementos de auxinas y se aclimataron en un sustrato compuesto tanto por humus de lombriz, como su combinación con zeolita (1:1) bajo condiciones de umbráculo y un sistema de riego por microjet.

Literatura citada

Ali, B.N., R.M.S. Mulwa, M.A. Norton, y R.M. Skirvin. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *J. Hort. Sc. Biotech.* 78(5):739-741.

Murashige and Skoog (MS) without any supplement of growth regulator. The sprouts obtained from the different explants were rooted in a cultivation media MS without supplement of auxins and were acclimatized in a substrate composed by worm humus and the combination of zeolyte (1:1) under threshold conditions and with a microjet irrigation system.

End of english version

Amin, M.N. y V.S. Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae* 36(1):89-95.

Beruto, M., L. Lanteri y C. Portogallo. 2004. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79(2):249-255.

Bhatt, I. D. y U. Dhar. 2004. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* bunch. – Ham. Ex D Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *African Journal of Biotechnology* 3(10):534-540.

Cantagallo, F.D., F.A. de Azevedo, E.H. Schinor, F.A. Mourão Filho y B.M. Januzzi Mendes. 2005. Micropropagation of 'swingle' citrumelo through axillary buds in vitro culture. *Rev. Bras. Frutic.* 27(1):136-138.

Campion, B. y M. Schiavi. 1997. An efficient method for *in vitro* propagation of peacock plants (*Calathea makoyana* Nichols). *Adv. Hort. Sci.* 11(1):73-76.

Cha-Um S., N.M. Tuan, K. Phummakong y C. Kirdimane. 2005. The *ex vitro* survival and growth of Ginger (*Zingiber officinale*. Roscoe.) Influence by in vitro acclimatization under high relative humidity and CO₂ enrichment conditions. *Asian Journal of Plant Sciences* 4(2):109-116.

Font, Q. 1993. *Plantas Medicinales*. Editorial Labor S.A. Barcelona, España.

- García, E., P. Lorente, J.A. Marín, A. Arbeloa y P. Andreu. 2010. Micropropagación e injerto *in vitro* de Pistacho. Información Técnica Económica Agraria 106(4): 294-302.
- George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd. 524p.
- Jiménez, F.A., D.P. Agramonte, J.N. Pérez, D. Ramírez, O. Gutiérrez y M.P. Pérez. 2001. Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* (L) var. Desirée. Biotecnología Vegetal 1(2):103-108.
- Haddadi, F., M.A. Aziz, G. Saleh, A.A. Rashid, H. Kamaladini. 2010. Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific shoot regeneration from in vitro shoot tips using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. HortScience 45(3): 453-456.
- Kanchanapoom, K. y K. Boonvanno. 2000. A protocol towards micropropagation of the piscicidal plant, *Maesa ramentacea* A. DC. ScienceAsia 26(2):201-205.
- Krikorian, A.D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. pp 95-126. En: Roca W.M. y L.A. Mrogrinski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones prácticas, CIAT.
- Ma, G. y G. Wu. 2006. Direct shoot organogenesis from cotyledons of *Ochna integerrima* (Lour) Merril. Propagation of Ornamentals Plants 6(3):143-148.
- Marks, T.R., Y.Y. Ford, R.W.F. Cameron, C. Goodwin, P.E. Myers y H.L. Judd. 2002. A role for polar auxin transport in rhizogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70(2):189-198.
- Misra, D., M. Misra y S.N. Tewari. 1997. Toxic effect of volatiles from *Callistemon lanceolatus* on six fungal pathogens of rice India. Phytopathology 50(1):103-105.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant. Physiol. 15: 473-497.
- Pandey, D.K. 1995. Fungitoxicity of essential oil of *Callistemon lanceolatus* DC against some sugarcane pathogens. Proc. Nat. Acad. Sci. India Sect. 65(1):73-80.
- Patil, V. y M.S. Kuruvinashetti. 1988. Micropropagation of *Eucalyptus teriticomis* using explants from mature and coppice shoots. Int. J. of Exp. Bot. 63(1-2):129-132.
- Pérez, A.T., L Nápoles, O. Concepción y R. Trujillo. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidos a partir de semillas. Cultivos Tropicales 23(3):57-61.
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi Prens. pp:109-115
- Rahman M.M., M.N. Amin, H.S. Vahan y R. Ahmed. 2004(a). *In vitro* regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. A valuable spice plant in Bangladesh. Asian Journal of Plant Sciences 3(3):306-309.
- Rahman, M.M., M.N Amin, T. Ahamed, M.R Ali y A Habib. 2004(b). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf base-derived Callus of *Kaempferia galanga* L. Asian Journal of Plant Sciences 3(6):675-678.
- Rodríguez, N.N., B. Velásquez y I. Cabrera. 2006. Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. 'Cotorrera' a partir de explantes nodales. Revista Citrifrut 23(2):45-52.
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1992. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. pp: 339-451.
- Singh, A.K., S. Chand, S. Pattnaik y P.K. Chand. 2002. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sissoo* Roxb. a timber yielding tree legume. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68(3):203-209.
- Sotolongo, R.S. 2000. Micropropagación de *Psidium salutare* (HBK) Berg. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Forestales. Universidad de Pinar del Río. Facultad de Agronomía y Forestal. Pinar del Río. p. 75.

- Teixeira, P.D., A. Lima Da Silva, J.P.H.J. Ducroquet y M.P Guerra. 2004. *In vitro* multiplication of *Prunus spp.* rootstocks 'Carelli'. Rev. Bras. Frutic. 26(2):377-379.
- Tilkat, E. y A. Onay. 2009. Direct shoot regeneration from in vitro-derived mature leaf explants of pistachio. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 45(1): 92-98.
- Roig, J.T. 1965. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. Editorial de Consejo Nacional de Universidades. Tomo II. 858 p.
- Villalobos, V.M. y T.A. Thorpe. 1991. Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. pp. 127-142. En: Roca W.M. y L.A. Mrogrinski (Eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones prácticas. CIAT.