

ESTUDIO DE LA PROPAGACION "IN VITRO" DE ACTINIDIA CHINENSIS PL. (KIWI)

García Reina, G.

Departamento de Biología
Centro Superior de Ciencias del Mar
Universidad Politécnica de Las Palmas

INTRODUCCION

La *Actinidia chinensis* Planch. (Chinese goosbery, Ichang), más conocida por su fruto, el kiwi, es un arbusto trepador caducifolio y dioico perteneciente a la familia de las Actinidiaceas. El fruto es de forma ovalada, de tamaño similar a la naranja con un sabor semiácido y que cada vez disfruta de mayor aceptación en el mercado europeo, de forma similar a lo que ocurre con el aguacate, mango o piña tropical aunque con menor introducción todavía. El fruto desde el punto de vista dietético presenta un gran interés por su alto contenido en sales minerales y vitaminas (Buisson, 1968; Randouin, 1945; Fenaroli, 1941) y en el mercado europeo se cotiza a precios muy elevados (de 1.000 a 1.500 Ptas./Kg.) estando considerado como postre de alta cocina.

El origen de la planta es chino de donde fue llevado a Inglaterra en la segunda mitad del siglo XIX, citando E.H. Wilson (1900) que "crece libremente en Inglaterra". En Francia es introducido en 1903 como curiosidad científica en el Museo de Historia Natural y ya en 1906 en Nueva Zelanda donde se seleccionaron variedades y se inicia la comercialización en la década de los cuarenta, estando actualmente en sus manos el 90% de la producción mundial debido a la alta calidad

del fruto, a su red de comercialización y a la producción continuada que le permite cubrir todo el año. (Madiéc y Sapin, 1981).

Actualmente se cultivan en el mundo alrededor de 3.000 has., de las cuales el 50% corresponden a Nueva Zelanda y el resto a Francia, Italia, EE.UU., Japón y España donde existen unas 250 has. de cultivo (Fruits vol. 35, n.º 2, 1980).

Las variedades que existen en cultivo proceden de las seleccionadas inicialmente en Nueva Zelanda y puesto que la planta es dioica, es decir, plantas con flores masculinas y plantas con flores femeninas, existen variedades comerciales de ambos sexos, siendo las femeninas Abbott, Allison, Bruno, Hayward y Monty y las masculinas Matua y Tomusi.

La propagación tradicional de las distintas variedades de *Actinidia Chinensis*, se realiza vegetativamente bien por injerto, acodo o estaca enraizada (Zuccherelli, 1978; Yousef-Bergamini, 1979; Smith, 1973; Forster, 1973; Casini y col., 1978) sin resultados satisfactorios desde el punto de vista aplicado (Bini, 1979; Monet, 1976). Por vía gámica no resulta práctico debido a que la especie es dioica y por tanto pasarían años antes de poderse conocer su sexo, así como por la variabilidad genética que comportarían las plantas obtenidas de semilla.

Tabla 1.— Composición química media del fruto de Actinidia.

Variedad	Abbot	Bruno	Hayward	Monty	Media gral.
Ac. Ascórbico (mg/100 gr. pulpa)	170	212	126	238	186,5
Azúcares reductores % (a)	6,9	8,7	7,4	6,9	7,5
Proteína %	0,93	0,97	0,87	1,04	0,95
Acidez titulable % (b)	1,43	1,61	1,43	1,21	1,42
Calcio (mg/100 gr. pulpa)	24,8	30,2	30,0	38,2	30,8
Fósforo (mg/100 gr. pulpa)	28,0	30,2	25,4	33,8	29,3
Magnesio (mg/100 gr. pulpa)	15,1	18,6	13,4	15,6	15,7
Potasio (mg/100 gr. pulpa)	273,0	315,6	234,2	353,1	294,0

(a) Determinado con el método de Fehling

(b) Expresado en ac. málico

Fuente: Froticultura, VII-VIII/54, 1979.

Las modernas técnicas de propagación por cultivo de tejidos "in vitro" que permiten la rápida obtención de grandes cantidades de material vegetal, fueron aplicadas por primera vez al kiwi por Harada (1975) quien obtuvo la formación de plantas a partir de embrioides y yemas adventicias a los dos meses de sembrar segmentos internodales de liana y raíz. Posteriormente se han empleado diferentes materiales de partida: fragmentos de hoja (Hirsh y Bligny-Fortune, 1979), filamentos estaminales (Tripathi y Saussay, 1980), receptáculos florales (Hirsch y Bligny-Fortune, 1979), fragmentos internodales (Kwei, 1981; Gui, 1979; Bini, 1979) y ápices vegetativos (Standardi, 1981; Bini, 1979).

La metodología y la técnica de cultivo "in vitro" varía con cada autor, aunque en la mayoría de las publicaciones describen la producción de plántulas a partir de callo, lo cual no da garantías de la conservación de las características varietales debido a las mutaciones que pueden aparecer por este sistema. (D'Amato, 1978; Skirvin y Janick, 1976; D'Amato, 1975; Bennicci, 1974).

La utilización de yemas laterales, y ápices vegetativos, si bien produce menor cantidad de material vegetal, garantiza la conservación de las características varietales. (D'Amato, 1975; Debergh y Maene, 1977; Murashige, 1974).

Objetivo del trabajo.— La posibilidad de introducir en Canarias el cultivo del kiwi por su alta rentabilidad, no como alternativa al plátano sino como un cultivo más de primor, con grandes posibilidades de exportación, nos llevó a estudiar la propagación de material vegetativo "in vitro" utilizando ápices, yemas laterales y segmentos internodales a fin de optimizar la técnica y reproducir las variedades de interés sin tener que importar las plantas madre.

MATERIAL Y METODOS

El material vegetal empleado lo constituyeron los sarmientos (lianas) invernales con las yemas aún cerradas, de las variedades Hayward y Matua. Sólo se sembraron ápices y

yemas de la variedad Hayward, efectuándose la siembra en el mes de febrero.

Se realizó un primer ensayo para determinar el tamaño óptimo del material a sembrar con relación a la técnica de desinfección. Los tamaños elegidos fueron tres, ápices de 0,3 a 0,4 mm., yemas de 0,8 a 1,5 mm., y yemas de unos 4 mm. La técnica de desinfección consistió en sumergir segmentos de la liana de unos 5 cm. con yemas, en una disolución de lejía comercial a una concentración de 15 g/l. de cloro activo durante 20 min. con humectante, para facilitar la impregnación del material, seguido de tres lavados de diez minutos con agua estéril. Una vez desinfectado se pasó a la separación de los ápices y yemas en los tamaños ya señalados. Dicha operación que se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar y bajo lupa binocular a 20X, resultó

bastante dificultosa debido a que el ápice, con la yema aún cerrada, se encuentra bien protegido por el tejido de ésta, así como por la gran cantidad de pelos que emiten los primordios foliares más desarrollados.

Un segundo ensayo consistió en la variación del balance hormonal en el medio de cultivo, manteniéndose constante la concentración de Zeatina (1 mg/l.) y empleando tres concentraciones de AIA (0,5 mg/l., 1 mg/l., 1,5 mg/l.).

Los explantos se introdujeron en tubos de ensayo de 12 mm de diámetro con dos ml. del medio de cultivo inorgánico de Murashige y Skoog (1962) excepto Fe, suplementado con FeNaEDTA (60 mg/l.) y los compuestos orgánicos que se señalan en la tabla 2, (Modificados de Harada, 1975).

Tabla 2.— Compuestos orgánicos añadidos al medio de cultivo, en mg/l.

Inositol	65
Adenina	40
Ac. Nicotínico	5
Piridoxina HCl	0,5
Ac. Fólico	0,5
Biotina	0,05
Glicina	2
Glutamina	500
Hidrolizado de Caseína	500
Agar	8.000
Sacarosa	20.000

El pH se ajustó previamente a 5,6 con NaOH 0,5 N. antes de añadir, en caliente, el agar (Bacto Difco).

El medio se esterilizó en autoclave durante 20 min. a 118 °C.

En la fase I de cultivo (establecimiento aséptico del cultivo y crecimiento a niveles más fácilmente manipulables) las hormonas y sus concentraciones fueron las siguientes: (en mg/l.).

Zeatina	1	1	1
AIA	1,5	1	0,5

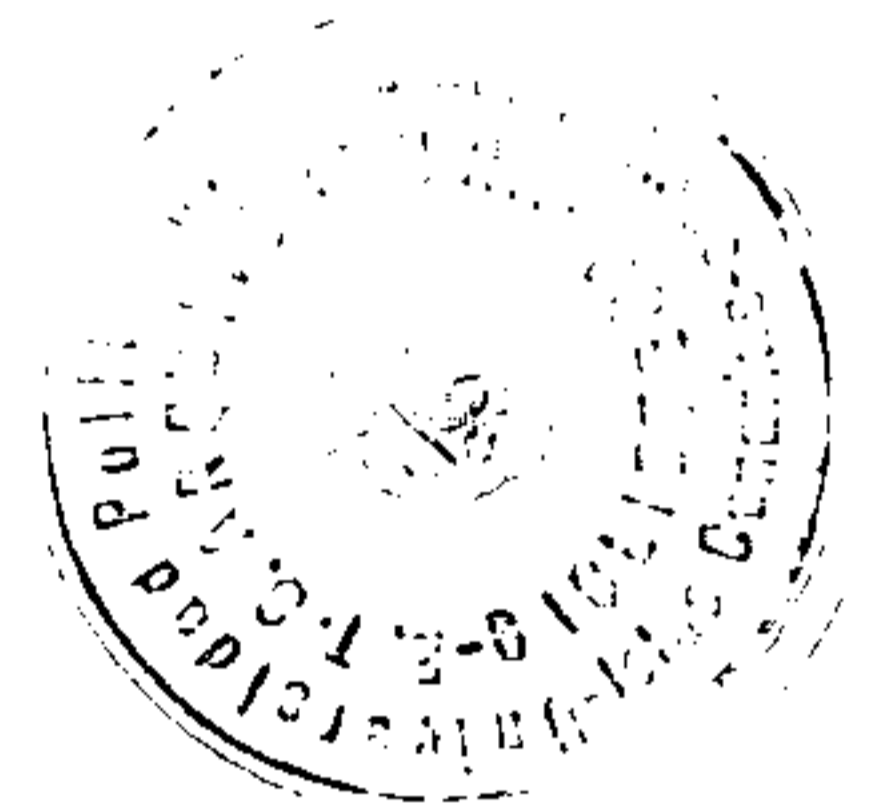
En las sucesivas etapas de la fase II (multiplicación vegetativa) las plantas obtenidas y

los callos fueron sembrados en tubos de 25 mm. de diámetro con 16 mm. de medio y finalmente en potes "Le Practique" de 1/2 l. con 50 ml. de medio.

La cámara de cultivo se mantuvo a 25 ± 1 °C., con un fotoperíodo de 16 h. luz y una intensidad de 1.000 lux emitida por tubos fluorescentes Gro-Lux.

Algunos potes se forraron con papel de aluminio dejando en la zona superior un orificio de 3 cm. recibiendo una intensidad de 300 lux, como forma de favorecer la elongación caulinar.

Un tercer ensayo consistió en la formación de callo y la generación de plantas a partir del mismo. El material de partida en este ensayo fue doble, por un lado los ápices vegeta-



tivos que formaron callo en los ensayos con AIA, particularmente en los medios con 1 y 1,5 mg/l. de AIA y el segundo a partir de segmentos internodales de liana, (1 - 2 mm. de ancho por 6 - 7 mm de diámetro), que también fueron sembrados en la fase de crecimiento en los tres medios descritos anteriormente. Una vez formado el callo, éste fue repicado a un medio sin AIA y con la concentración de adenina reducida a 28 mg/l., ya que en trabajos anteriores con *Pelargonium* observamos que el exceso de adenina genera y mantiene el callo sin diferenciar (García, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSION

1.— **Resultado del tamaño de la siembra.**— Cuanto menor era el tamaño del material sembrado más baja fue la tasa de contaminación, lo que coincide con los resultados de otros autores. Los ápices entre 0,3 y 0,4 mm. de tamaño no sufrieron contaminaciones, mientras que las yemas de 4 mm. aparecieron a los diez días de cultivo contaminadas en su totalidad, siendo particularmente importantes las contaminaciones por hongos (95%), estando el resto contaminados únicamente por bacterias (5%).

El rango de tamaño entre 0,8 y 1,5 mm. presentó un índice de contaminación del 17,4% que se puede considerar óptimo, ya que Standardi (1981) sembrando en un rango similar obtuvo una tasa de contaminación del 16,6%. Este tamaño del ápice es el más adecuado desde el punto de vista aplicado debido a su fácil manejo y además por tener un crecimiento más rápido y viable que los ápices de 0,3 - 0,4 mm.

2.— **Resultados del ensayo hormonal.**— Con concentraciones de AIA de 1 y 1,5 mg/l. los ápices crecieron rápidamente y adquirieron a los diez días un color verde fuerte, pero formando un callo blanquecino en la zona basal de escisión. A los 20 días el callo continuaba desarrollándose constituyendo el 75% del material vegetal y el ápice que estaba sobre el callo sufría un paulatino proceso de desorganización, adquiriendo un aspecto vitrificado con células hipervacuolizadas y desapareciendo los pelos amarillentos de los esbozos foliares. El resultado final de estos tratamientos fue la formación de un callo indiferenciado de color verde.

El tratamiento con 0,5 mg/l. de AIA presentó un crecimiento y pigmentación del ápice

menor que los anteriores pero la formación de callo también era considerablemente menor.

A los diez días de cultivo se trasplantaron a tubos de 25 mm. de diámetro y 16 ml. con el mismo medio de cultivo anterior, en el que se había suprimido el AIA y rebajado la concentración de adenina a 28 mg/l. En este medio los ápices crecieron rápidamente sin perder la organización, dando lugar a los treinta días de cultivo a plantitas de unos 3-4 cm. de altura, que fueron repicadas a potes "Le Practique" con 50 ml. de medio. A los 20 días de cultivo en pote las plantas habían doblado prácticamente su desarrollo y comenzaron a aparecer yemas y en muchos casos plantitas en la zona de contacto entre el tallo y el callo basal. Este callo, nodulado, compacto y duro, presentaba al cortarlo una gran vascularización.

Debido a que las plantas presentaban un desarrollo vigoroso con abundantes y grandes hojas pero con poco crecimiento del tronco, se intentó la inducción del crecimiento caulinar creando condiciones de baja intensidad lumínica (300 lux) que produjeron, a los 30 días, un alargamiento general del tallo y la brotación de yemas axilares en plantas con tallo superior a los 3 cm.

Las plantas que no respondieron a la baja intensidad lumínica, fueron tratadas con Ac. giberélico a una concentración de 0,02% en el medio de cultivo, teniendo una respuesta variable a este tratamiento.

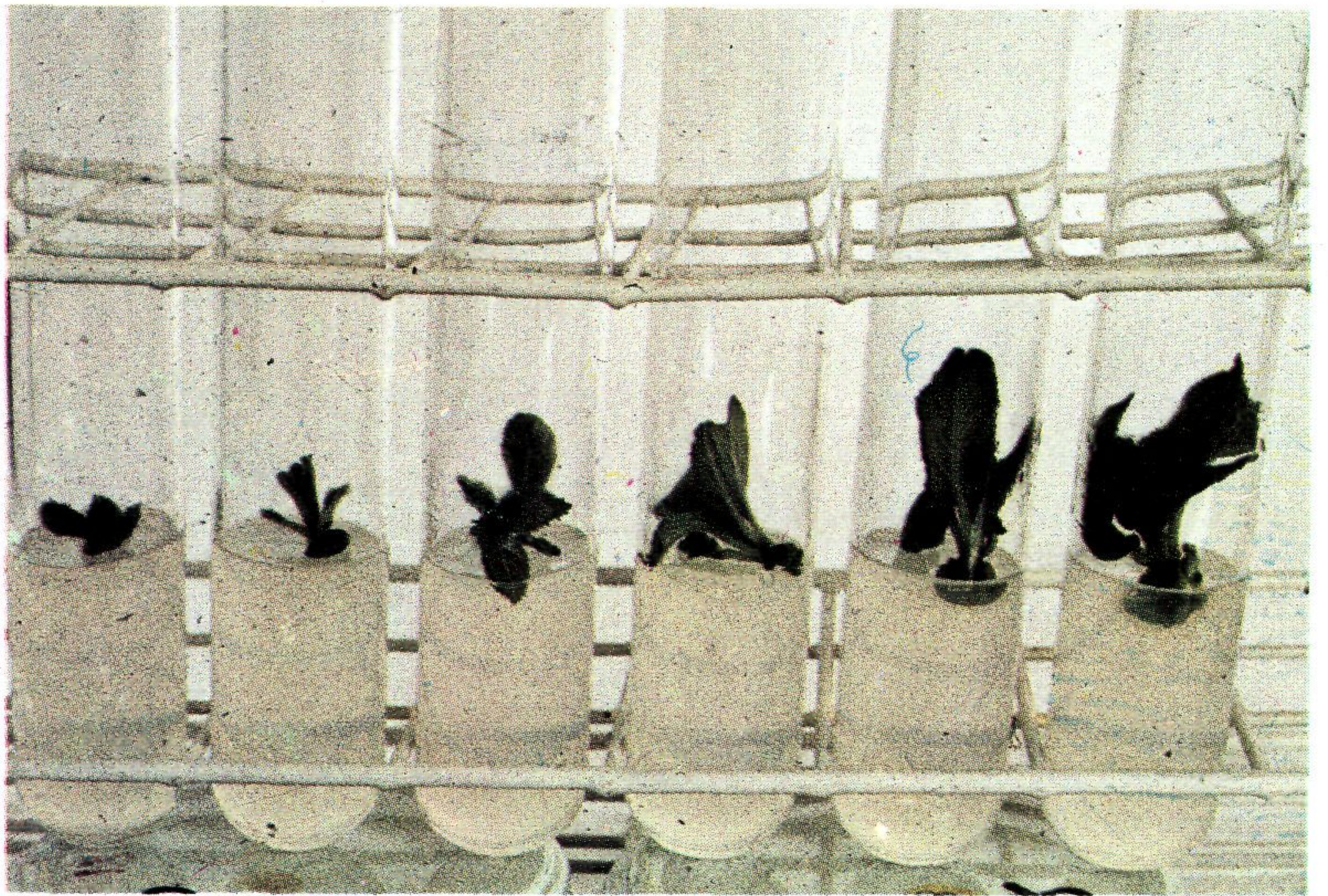
Las plantas que habían crecido lo suficiente se separaron del callo basal y fueron cultivadas en el mismo medio hasta su enraizamiento y paso posterior a invernadero.

Los callos basales que presentaban un aspecto nodulado previo a la brotación de nuevas yemas, fueron resembrados nuevamente como veremos a continuación.

3.— **Resultados del cultivo de callo.**— En el cultivo de callo se partió de tres materiales diferentes como exponíamos en material y métodos. El primero a partir de segmentos internodales, el segundo a partir de los callos generados en los tratamientos hormonales con 1 y 1,5 mg/l. de AIA y el tercero del callo basal formado en las plantas que se cultivaron inicialmente con 0,5 mg/l. de AIA.

3.1.— **Cultivo de callo a partir de segmento internodal.**— El material de partida fue desinfectado como se expuso en material y métodos y se tomaron segmentos de 1-2 mm. de ancho por 6-7 mm. de diámetro de ramas

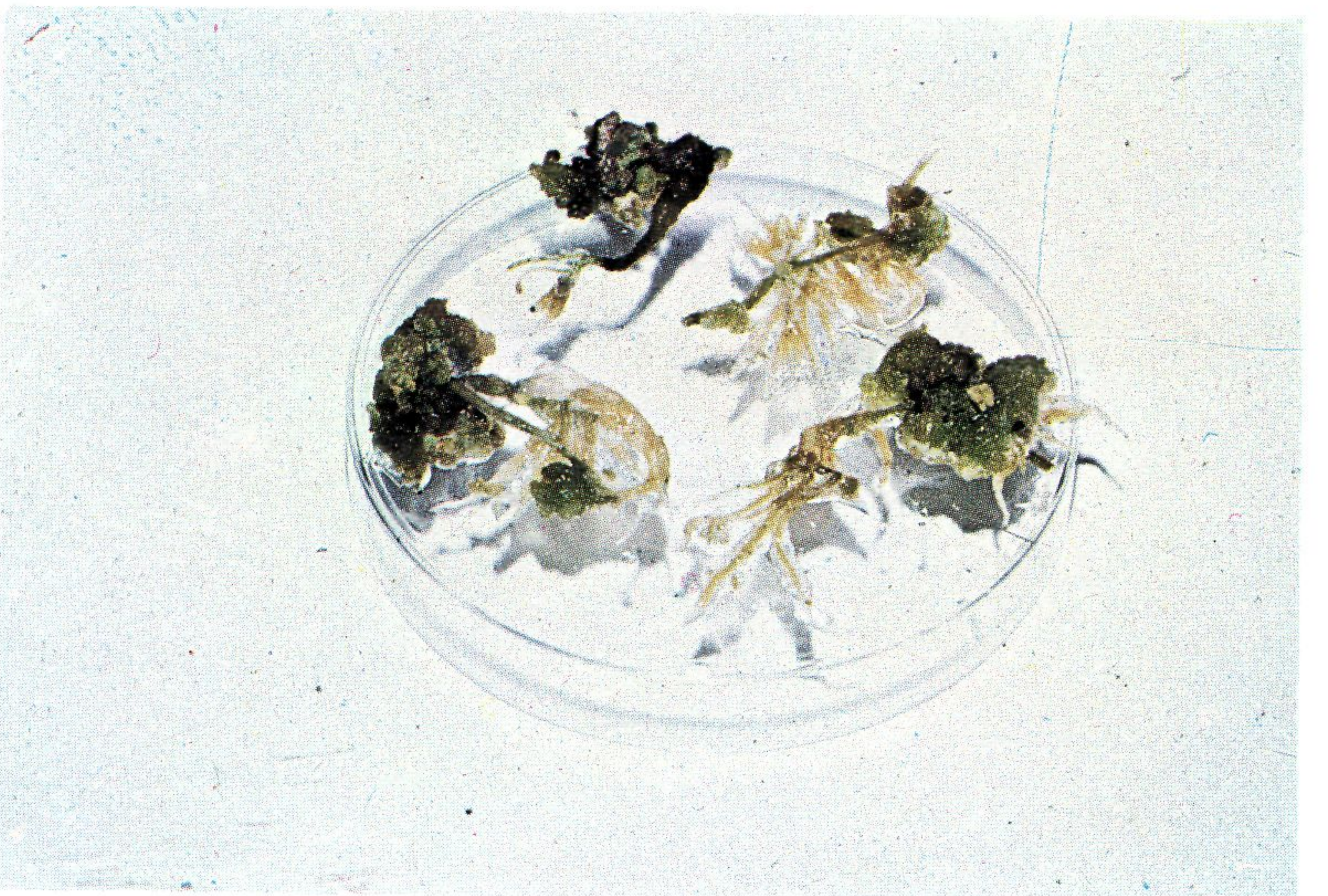
Crecimiento secuencial de kiwi a partir de ápice



Plántula de kiwi a los 50 días de cultivo de la yema. Nótese el callo nodulado basal



Rizogénesis de las yemas desorganizadas en medios de cultivo sin hormonas. Ausencia de yemas caulinares

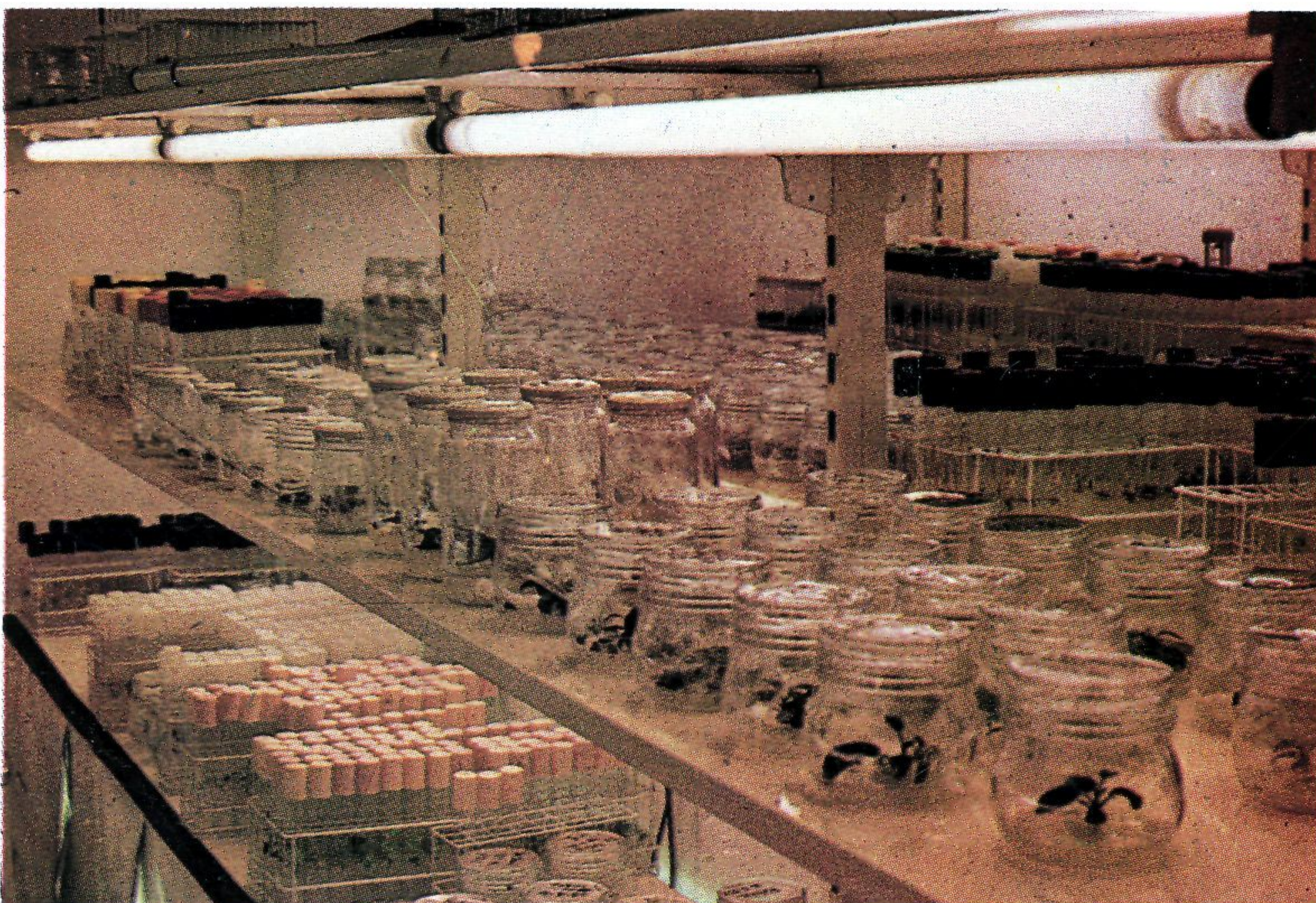




Callos de segmentos internodales. Nótese la diferencia de textura y morfogénesis entre callos masculinos y femeninos (60 días de cultivo)



Proliferación de plántulas a partir de callo basal



Vista parcial de la cámara de cultivo con potes de kiwi en propagación

de patrones femeninos (Hayward) y masculinos (Matua). Se cultivaron inicialmente en las tres concentraciones de AIA descritas, pero únicamente hubo desarrollo de callo en el medio con 1,5 mg/l. de AIA, es decir, en el de mayor concentración. A los 30 días de cultivo el 100% de los callos viables procedentes de segmentos de tronco masculino comenzaron a diferenciarse originando callo verde. Sin embargo este porcentaje fue del 70% en el material procedente de troncos femeninos, formando éste un callo más pequeño y con menor pigmentación. Estos resultados coinciden con los señalados por otros autores (Harada, 1975; Gui, 1979; Kwei, 1981) que también encuentran diferencias sexuales en el potencial morfogénico de segmentos internodales y con resultados contradictorios.

Los callos formados fueron pasados a un medio sin AIA y menor contenido de adenina (28 mg/l.). A los 30 días de cultivo en este medio se mantenían las diferencias entre los callos masculino y femenino, siendo los primeros nodulados y pigmentados mientras que los segundos presentaban una estructura lisa, sin nodulaciones, y menor o total ausencia de pigmentación.

A los dos meses de cultivo en este medio los callos masculinos originaron plantas con una tasa 1:10, mientras que los femeninos no dieron lugar a planta alguna.

3.2.— Cultivo de callo generado en tratamientos con AIA (1 - 1,5 mg/l.).—

Estos callos fueron repicados al medio sin AIA y baja concentración de adenina, donde a los 35 días de cultivo presentaban nodulaciones sin emergencia de planta. Se repicaron nuevamente a otro medio sin hormonas ni adenina, comenzando a aparecer a los diez días de cultivo raíces superficiales, que debido al alto requerimiento de oxígeno, son propias del género *Actinidia* (Youssef y Bergamini, 1979; Standardi, 1981) A los 45 días de cultivo los callos aparecían completamente nodulados. Estos callos fueron repicados al mismo medio en que crecían los callos provenientes de segmento internodal, dando lugar a la producción de plantas en los callos donde no habían aparecido raíces.

Hay que señalar que también se ensayaron otros balances hormonales con ANA (1 - 0,01 mg/l.) y BA (1 mg/l.) o Kinetina (2 mg/l.) sin que ninguno de estos medios diera resultados positivos, ya que había producción de

raíces pero no formación de plantas y los callos nodulados tomaban coloración parduzca.

3.3.— Cultivo de callo basal.— Estos callos fueron cultivados directamente en el mismo medio que los callos generados de segmento internodal, dando lugar a la formación de plantas con una elevada tasa de propagación.

CONCLUSIONES

El tamaño de los ápices para conseguir un nivel de desinfección aceptable y un rápido desarrollo del mismo está entre 0,8 y 1,5 mm.

El nivel inicial de AIA en el medio de cultivo que aparece como óptimo es de 0,5 mg/l, ya que valores más altos provocan un excesivo crecimiento del callo y la desorganización de los ápices sembrados.

La obtención de plantas para su posterior siembra se puede producir por dos vías; la primera a partir de ápices y la segunda a partir del callo basal generado por éstos, de segmentos internodales de sarmiento (liana) de patrones masculinos, o de callo desorganizado a partir de ápice, sin embargo, en estos casos no se puede garantizar la estabilidad varietal de las plantas formadas.

La emisión prematura de raíces bloquea el posterior desarrollo de las yemas caulinares, por lo que pueden desecharse como no útiles, en cuanto a la propagación, los callos que las emitan con anterioridad a la aparición de plantas.

El material de partida (segmentos internodales) da diferente respuesta según proceda de plantas masculinas o femeninas, presentando mayor potencial morfogénico los segmentos masculinos que los femeninos, por lo que este último necesitará de más investigación en cuanto a la composición hormonal del medio y al método de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- BENICCI, A. (1974). *Cytological análisis of roots, shoots and plant regenerated from suspension and in solid "in vitro" culture of haploid Pelargonium*. Z. Pflanzenzüchtg. 7: 199 - 205.
- BINI, G. (1979). *Moltiplicazione "in vitro" di Actinidia Chinensis Pl.* Atti Convegno "Technique de coltura in vitro" per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticola. 211 - 18. Pistoia 6 Ottobre.
- BUISON-LEFRESNE, J. (1968). *Quelques fruits exotiques sur le marche francais. Leur valeur Nutritionelle*. L'Alimentation et la vie, 56: 5 - 13.

- CARRERA, M. (1976). *Consideraciones sobre el cultivo en España de la Actinidia Chinensis*. I.T.E.A., 22: 21 - 23.
- CASINI, E., GIUBILARO, S., MAGNANI, G.P. (1978). *Recerche ed osservazioni sulla propagazione per talea del Actinidia Chinensis*. Incontro frutticolo. S.O.I., Actinidie, Torino. 27 / 10 / 78.
- D'AMATO, F. (1978). *Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants*. Proc. 4th. Int. Congress of P.T.C.C. Calgary. p.p. 287 - 295.
- D'AMATO, F. (1975). *Crop Genetic Resources for today and tomorrow*. Cambridge University Press. p.p. 333 - 348.
- DEBERGH, F.; MAENE, L. (1977). *Rapid clonal propagation of patogen free Pelargonium plants starting from shoots tips and apical meristems*. Acta Hort., 78: 449 - 454.
- FORSTER, H.P. (1973). *The Chinese gooseberry*. Seed and Nursery Trader n.º 71, 10, 17, 19, 21, 23. Burnley Horticultural College, Victoria Australia.
- FENAROLI, L.; KOKOWA, E. *Yang-Tao, le piante della salute*. Nuovi Orizzonti delle Frutticoltura, XVII, 11.
- FOSSARD de R.A. (1976). *Organ culture for the propagation of Chinese goosberry (Actinidia chinensis)*. En: Tissue culture for plant propagators, Dept. Botany, Univ. of New England, Australia, June, pp. 191-192.
- GARCIA REINA, G. (1981). *Cultivo "in vitro" de ápices meristemáticos de Pelargonium hortorum var. Rubin*. Tesina Dept. Fsiol. Vegt. Universidad de Barcelona.
- GUI, Y.L. (1979). *Induction of callus and regeneration of plantlets in stem segment culture of Chinese Gooseberry*. Acta Botánica Sinica, 21, (4): 339-344.
- HARADA, M. (1975). *"In vitro" organ culture of Actinidia chinensis Pl. as a technique for vegetative multiplication*. Journal of Horticultural Science, 50, (1): 81-83.
- HIRSCH, A.M. (1975). *Sur le culture de tissus de fruits d'Actinidia chinensis et le metabolisme des amines libres de fragments de tiges cultivées "in vitro"*. C.R. Acad. Sci. Paris. T. 280. Serie D - 1.369 - 1.372.
- HIRSCH, A.H. et BLIGNY-FORTUNE, D. (1979). *Organogenese dans les cultures de tissus de deux plantes appartenant au genre Actinidia (Actinidia chinensis et Actinidia polygama). Relations entre organogenese et peroxidase*. C.R. Acad. Sci. Paris. T. 288 serie D - 1.159 - 1.162.
- KWEI, Y.L. (1981). *Induction of callus and plantlet from stem segments in Chinese Gooseberry*. Proceedings of Symposium of Plant Tissue Culture. London. Pitman. Publishing Limited pp. 526.
- MADIEC, H. et SAPIN, P. (1981). *Panton encore planter du Kiwi. A quel prix?* (1981). P.H.M. Revue Horticole, n.º 213. Janvier 1981.
- MONET, R. (1976). *L'Actinidia de Chine*. Arboriculture Fruticole, 267: 21 - 24.
- MURASHIGE, T. (1974). *Plant cell and organ culture in the establishment of patogen free stock*. 2nd. annual A.W. Dimock Lecture. Cornell University, Ithaca, New York.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962). *A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plantarum, 15: 473 - 497.
- RANDOUIN, L., BEISELET, J. (1945). *Valeur energetique minerale at vitaminique du fruit comestible d'Actinidia chinensis Pl.* Bull. Soc. Scient. Hyg. Aliment. 144 - 53.
- RANDOUIN, L., BEISELET, J. (1941). *Composition et teneur en vitamines des fruits d'Actinidia chinensis*. C.R. Seanc. Biol., 85: 209 - 12.
- SKIRVIN, R.M. and JANIK J. (1976). *Tissue culture induced variation in scented Pelargonium sp.* J. Amm. Soc. Hort. Sci.; 101: 281 - 290.
- SMITH, G.B. (1973). *Rooting Actinidia chinensis (Chinese Gooseberry or Kiwi fruit) cuttings*. The Plants Propagators, 19 (1): 10 - 11.
- STANDARDI, A. (1981). *Micropagazione del l'Actinidia chinensis Pl. mediante coltura "in vitro" di apici meristematici*. Frutticoltura, Bologna, 43 (1): 23 - 27.
- TRIPATHI, B.K. et SAUSSAY, R. (1980). *Sur la multiplication vegetative de L'Actinidia chinensis Planchon "Chinese gooseberry" par culture de issues de filets staminaux*. C.R. Acad. Sci. Paris T. 291., serie D - 1.067 - 1.069.
- YOUSSEF, J. - BERGAMINI, A. (1979). *L'Actidinia (Kiwi, Yang-Tao) e la sua coltivazione*. Frutticoltura, Bologne VII - VIII, 13 - 61.
- ZUCCHERELLI, G. (1978). *Prove di propagazione par inesto del l'Actinidia chinensis*. Rapporto presentato al incontro frutticolo "l'Actinidia", organizzato delle S.D.I. Torino, 27 Ottobre 1978, 39 - 43.

Agradecimientos: a D. Enric Mele y Dña. Joaquina Messeguer del área de fisiología vegetal del Servicio de Investigación Agraria de la Generalitat de Cataluña por las facilidades prestadas y al Dr. Angel de Luque por la crítica y asesoramiento en la redacción del trabajo.

ABREVIATURAS:

AIA = Acido Indolacético
AIB = Acido Indolbutírico
BA = Benziladenina