

GERMINACIÓN Y MICROPROPAGACIÓN DE *FICUS* *OBTUSIFOLIA*, *F. JIMENEZII* Y *F. MORAZANIANA* (MORACEAE)

Lisette Valverde Cerdas¹, Ana Hine Gómez¹

¹Instituto de Investigación y Servicios Forestales
Universidad Nacional, Heredia 86-3000, Costa Rica. Fax: (506) 237 4151
Corel: lvalverd@una.ac.cr, ahine@una.ac.cr

ABSTRACT

Germination and *in vitro* culture of three species of figs: *Ficus obtusifolia* Kunt, *F. jimenezii* Standl and *F. morazaniana* Burger were studied. Semi-ripen seeds of these species were distributed in four types of substrates (culture medium, sand, soil and newspaper) under three different conditions (*in vitro*, ambient and greenhouse). *In vitro* germination and micropropagation was only possible in *F. jimenezii* due to the fact that seeds of the other species presented high bacterial contamination. This was also the best method for the production of this species. The newspaper substrate showed high germination percentages in the three test species and this facilitated the transference of plantlets to other substrates for their growth under *in vitro* conditions. *F. obtusifolia* and *F. jimenezii* showed the lowest germination percentages in the sand substrate 60% y 10% respectively. The germination of *F. obtusifolia* and *F. morazaniana* was possible in pots under greenhouse conditions but the plantlets growth was lower with respect to other methods evaluated. For those plantlets germinated under ambient conditions the best growth was obtained in closed flasks with pit substrates placed in a growth chamber with a photoperiod of 16 hrs light and a light intensity of $30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Plants developed well in the greenhouse where they were fertilized and grew for a period of 12 months.

Key words: Moraceae, figs, *Ficus jimenezii*, *Ficus obtusifolia*, *Ficus morazaniana*, micropropagation, germination.

RESUMEN

Se estudió la germinación y el cultivo *in vitro* de tres especies de higuerones: *F. obtusifolia* Kunt, *F. jimenezii* Standl y *F. morazaniana* Burger. Semillas semimaduras de estas especies se distribuyeron en cuatro tipos de sustrato (medio de cultivo, arena, tierra y papel periódico) bajo tres diferentes condiciones (*in vitro*, ambiente e invernadero). Solo fue posible la germinación *in vitro* y la micropropagación de *F. jimenezii*, dado que las semillas de las otras especies presentaron una alta incidencia de contaminación bacteriana. Este método resultó ser el mejor para la producción de esta especie. El sustrato de papel periódico mostró altos porcentajes de germinación en las tres especies y facilitó la transferencia de las plántulas a otros sustratos para su crecimiento en condiciones *in vitro*. *F. obtusifolia* y *F. jimenezii* mostraron más bajos porcentajes de germinación en el sustrato de arena 60% y 10%, respectivamente. La germinación de *F. obtusifolia* y *F. morazaniana* es posible en un recipiente en condiciones de invernadero, pero el crecimiento de las plántulas es inferior con respecto a los otros métodos evaluados. Para las plántulas germinadas en condiciones ambientales, el mejor crecimiento se obtuvo en frascos cerrados con un sustrato de turba, colocados en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas luz y

una intensidad lumínica de $30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las plantas se desarrollaron bien en el invernadero donde fueron fertilizadas, permaneciendo ahí por un período de doce meses.

INTRODUCCIÓN

El género *Ficus* constituye un grupo de plantas muy importante en la ecología del bosque tropical por su abundancia de especies, abundancia poblacional y porque produce siconios durante todo el año (Montero 1991). Solo en Costa Rica se han registrado alrededor de 53 especies de *Ficus*, de las cuales 47 son nativas (J. González, com. pers.). Estas especies poseen una gran formación de raíces y copas muy frondosas, por lo que han sido muy utilizadas para sombra, en la protección de cuencas, para evitar erosión de terrenos, como cercas vivas, alimento para aves y ornamentales. Una de las características más sobresalientes de este género es su gran adaptabilidad a una amplia gama de condiciones ambientales. Journet y Conway (2001) refiriéndose a estas mencionan que parches de bosque en pasturas tropicales sirven como foco de atracción para la colonización de especies y que árboles con frutos carnosos y una copa densa atraen aves de bosques cercanos y proveen una mayor cantidad de semillas que otros géneros.

A pesar de las cualidades que poseen han sido especies a las que no se les ha prestado mucha atención, debido a que no son comerciales desde el punto de vista maderable, razón por la cual es muy poca la literatura relacionada con aspectos tecnológicos de su cultivo, aunque sí se cuenta con estudios taxonómicos de las especies (Burger 1977, Ramírez 1979 y J. González, com. pers.), de biología reproductiva (Berg 1990) y de estudios fenológicos (Milton *et al.* 1982 y Montero 1991) en algunas de ellas.

Las especies *F. jimenezii* Standl, *F. morazaniana* Burger y *F. obtusifolia* Kunt prefieren las formaciones secas del bosque siempreverde, aunque también se pueden hallar en el bosque húmedo.

F. jimenezii es un árbol que crece hasta 25 m de alto. Se reconoce por sus hojas elípticas, gruesas y glabras con venación oscura, estípulas pubescentes. Los siconos son pequeños con brácteas conspicuas, se dan en pares y muy hundidos en las ramillas de las que brotan, con una distribución muy restringida (Burger 1977 y J. González, com. pers.).

F. morazaniana es un árbol de hasta 25 m, a veces epifito. Se reconoce por sus hojas y tallos pubescentes, siconos pareados, pedunculados con una superficie muy pubescente y pequeñas brácteas (Burger 1977 y J. González, com. pers.).

F. obtusifolia es una especie que crece hasta 35 m, a veces epifito. Se reconoce por sus hojas glabras con el ápice obtuso o redondeado y por sus siconos pubescentes con brácteas grandes. Sus hojas son mayormente obovadas con siconos pareados subsésiles o con pedúnculos (Burger 1977 y J. González, com. pers.).

Este trabajo tiene como objetivo aportar información que contribuya a incrementar el conocimiento y manejo del cultivo de estas tres especies de higuerones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Especies Forestales del Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional.

Se realizaron tres ensayos para la germinación de semillas semimaduras de *F. obtusifolia*, *F. morazaniana* y *F. jimenezii*, todas procedentes de la finca Los Inocentes Lodge, ubicada en La Cruz de Guanacaste.

Un primer ensayo se estableció bajo condiciones de asepsia. Para ello, los frutos de *F. morazaniana* y *F. obtusifolia* fueron lavados con agua y jabón en continua agitación por un período de 30 minutos y seguidamente se sumergieron en una solución de cloro comercial al 3,5% por 30 minutos. Los frutos de *F. jimenezii* por ser más pequeños y tener siconos de tejido más suave, solo se mantuvieron en agua y jabón durante 10 y 20 minutos en la solución de cloro comercial al 3,5%. Después de la desinfección con cloro el material fue llevado a una cámara de flujo laminar, donde se lavó con agua destilada esterilizada y se seccionaron los frutos para extraer las semillas que fueron inoculadas directamente, o bien, los embriones extraídos de estas, en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) completo, suplementado con 30 g l^{-1} de sacarosa y 7 g l^{-1} de agar.

En un segundo ensayo, de tres tratamientos, las semillas fueron desinfectadas usando el procedimiento anterior, pero adicionalmente unas se trataron con el fungicida Vitavax a razón de 250 mg l^{-1}

durante 20 minutos, otras con una solución de cloruro de mercurio al 0,01% por 2 minutos y otras fueron sumergidas en 0.1 mg l^{-1} de GA_3 durante 30 minutos. Todas se inocularon en recipientes asépticos que contenían arena esterilizada y fueron regadas cada 10 días. Ambos ensayos se colocaron bajo condiciones controladas con un fotoperíodo de 16 horas luz y una temperatura de 26°C .

El tercer ensayo consistió en dividir 100 frutos a la mitad y extraerles las semillas, que fueron distribuidas en dos sustratos diferentes: arena esterilizada y hojas de papel periódico. A estos dos tratamientos se les dieron ciclos de riego manual en períodos de cinco días seguidos de tres días sin riego. En el último tratamiento, frutos de *F. morazaniana* y *F. obtusifolia* fueron divididos en cuatro partes y aglomerados fueron puestos en un recipiente sin sustrato bajo condiciones de invernadero con un período de riego similar al descrito en el ensayo anterior. La cantidad de semilla de *F. jimenezii* no permitió esta prueba.

Las plántulas de *F. jimenezii* germinadas bajo condiciones de asepsia fueron seccionadas para su multiplicación *in vitro* y cultivadas en un medio de cultivo M&S (1962), al que se le adicionó carbón activado.

Las plántulas que germinaron bajo condiciones ambientales fueron transferidas con pinzas o espátulas a frascos que contenían dos diferentes tipos de sustrato para su posterior desarrollo: un sustrato esterilizado a base del musgo *Spaghnum* y un sustrato a base de tierra esterilizada. Los tratamientos fueron colocados en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas con un fotoperíodo de 16 horas, $30 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$, una temperatura de 26°C y se regaron con agua destilada y esterilizada cada 22 días. Se sembraron de una a cuatro plántulas por frasco. En cada tratamiento se evaluó el porcentaje de germinación.

Anterior al traslado de las plantas al invernadero, estas se mantuvieron en los frascos sin tapa en un cuarto bajo condiciones ambientales por un período de cuatro días, con el fin de lograr un preendurecimiento de las hojas. Seguidamente, las plántulas fueron transferidas a bolsas de polietileno con tierra y se conservaron en el invernadero bajo techo por un período de dos semanas, para lograr un mayor endurecimiento.

Las plantas fueron llevadas al invernadero para su aclimatación bajo riego frecuente y fueron

fertilizadas con urea cada cuatro meses por un período de ocho meses. Se midió la altura de las plantas un mes antes de la fertilización y luego cada dos meses. Las plántulas germinadas bajo condiciones de invernadero se trasplantaron directamente a bolsas negras de polietileno, para plantas de 11 meses, cuando alcanzaron una altura de 2 cm.

RESULTADOS

En el primer ensayo, solo la especie *F. jimenezii* logró establecerse *in vitro*, ya que con las otras especies se presentó una alta incidencia de contaminación, debida a un crecimiento bacteriano en el medio de cultivo. Las semillas de *F. jimenezii* empezaron a germinar 22 días después de haberlas colocado en el medio de cultivo y 50 días después aún estaban germinando unas pocas. La germinación de los embriones se inició a los 16 días de cultivo y respondieron bien al medio de cultivo. A los 60 días, las plantas estaban listas para ser aclimatadas. Las secciones nodales de estas plántulas, que fueron cultivadas en el medio de cultivo M&S (1962) suplementado con carbón activado, formaron nuevas plantas sin necesidad de adicionar auxinas para el enraizamiento de las yemas desarrolladas.

Las semillas colocadas en el sustrato de arena esterilizada y mantenidas en el cuarto de crecimiento no germinaron en ninguno de los tratamientos probados. Las semillas del tercer ensayo, colocadas en la arena esterilizada bajo condiciones ambientales, comenzaron a germinar 30 días después y continuaron germinando hasta por 30 días más. Un 100% de las semillas de *F. morazaniana* germinaron bajo estas condiciones y tan solo un 60% de las semillas de *F. obtusifolia* y un 10% de las semillas de *F. jimenezii*.

La mayor cantidad de semillas germinadas se observó con el sustrato de papel periódico, en el cual germinaron el 100% de las semillas de *F. morazaniana* y *F. obtusifolia* y un 97% de las semillas de *F. jimenezii* (Cuadro 1). En este tratamiento, las tres especies respondieron favorablemente e iniciaron la germinación a los 21 días y se prolongó hasta por un período de 90 días. A su vez, este tratamiento facilitó la transferencia de las plántulas a los frascos para su crecimiento.

La abundancia de las semillas de las especies *F. morazaniana* y *F. obtusifolia* favoreció los

Cuadro 1
Porcentaje de germinación de tres especies de *Ficus* en diferentes condiciones y sustratos

Tratamientos	Porcentaje de germinación		
	<i>F. morazaniensis</i>	<i>F. jimenezii</i>	<i>F. obtusifolia</i>
Condiciones <i>in vitro</i>			
Medio de cultivo	–	100	–
Arena esterilizada	0	0	0
Condiciones ambientales			
Arena esterilizada	100	10	60
Papel periódico	100	97	100
Condiciones de invernadero			
Recipiente sin sustrato	100	–	100

altos porcentajes de germinación de estas especies en comparación con *F. jimenezii*, que posee menor cantidad de semillas por fruto y porque algunas eran vanas, lo cual se corroboró en el ensayo de extracción de embriones.

La transferencia de las plántulas apenas iniciaba su germinación, ya sea individualmente o en grupos al sustrato con musgo bajo condiciones de luminosidad controladas, favoreció su crecimiento y permitió ahorrar espacio y cuidado de estas y no se observó mortalidad.

La densidad de plantas por frasco afectó su desarrollo, ya que a una sola planta le tomaba de tres a cinco semanas para ser transferida al invernadero, mientras que más de tres plantas por frasco se tardaban hasta ocho semanas para su transferencia.

Las especies *F. obtusifolia* y *F. morazaniensis* en condiciones de invernadero también resultaron en un 100% de germinación, pero esta fue más escalonada en el tiempo.

F. jimenezii fue la especie que mostró una mayor resistencia al ser transferidas las plantas a bolsas al igual que *F. morazaniensis*, a diferencia de *F. obtusifolia* que es una especie bastante susceptible cuando se transfieren las plántulas a bolsas.

No se observó ningún efecto negativo del fertilizante y, por el contrario, las

especies mostraron una gran respuesta en crecimiento a la fertilización. Durante la primera fertilización se observó un brote del hongo *Cercosporidium sp.* en algunas plantas de *F. obtusifolia*, que se detuvo con aplicaciones frecuentes de benomyl a razón de 5 g l⁻¹.

El crecimiento promedio en altura de las tres especies de *Ficus* en función del tiempo se aprecia en la Figura 1, donde se observa que existían diferencias significativas en la altura ($p \geq 0.01$) entre *F. morazaniensis* y las otras dos especies en la primera y segunda medición; sin embargo, esta especie incrementa su crecimiento en los dos últimos meses hasta alcanzar un tamaño semejante a las otras dos especies.

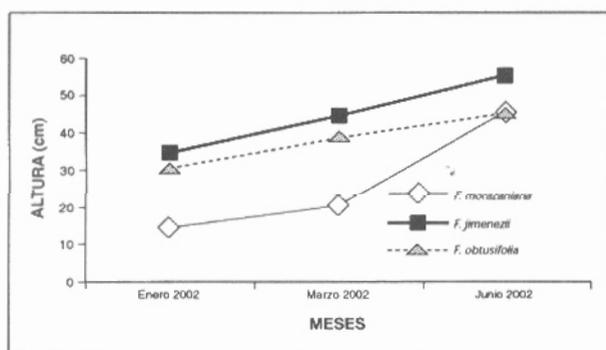


Figura 1. Crecimiento promedio en la altura de las tres especies de *Ficus* en función del tiempo.

El incremento en el crecimiento promedio en altura para los seis meses de estudio fue de 33 cm para *F. morazaniensis*, de 22 cm para *F. jimenezii* y de 17 cm para *F. obtusifolia*, lo que indica diferencias altamente significativas en crecimiento entre las tres especies ($p \geq 0.01$).

DISCUSIÓN

Similar a lo observado por otros autores (Rai *et al.* 1988) con otras especies, cuando se abrieron frutos muy maduros de *F. morazaniensis* y *F. obtusifolia*, estos estaban infestados por diferentes estados de desarrollo del parasitoides *Idarnes sp.* (Dr. W. Ramírez, com. pers.).

La alta contaminación de las semillas por bacteria impidió establecer un protocolo eficiente de desinfección en *F. obtusifolia* y *F. morazaniensis*, por lo que se tuvo que recurrir a una combinación de métodos asépticos y métodos convencionales, con el fin de obtener un sistema eficiente de germinación y de desarrollo de las plantas. Con *F. jimenezii* sí se logró su establecimiento *in vitro*, obteniéndose mejores resultados, ya que el 100% de las semillas germinaron y el desarrollo de las plantas fue mejor que el observado con los otros sustratos evaluados. Este sistema ahorró tiempo tanto en la salida de las plantas al invernadero como en la manipulación de las mismas.

El medio de cultivo favoreció el crecimiento de las plantas y facilitó la multiplicación seriada de la especie a partir de segmentos nodales y yemas apicales, mientras que otros autores han utilizado explantes de brotes apicales y segmentos nodales de árboles adultos de algunas especies del género *Ficus* como *F. carica*, *F. religiosa* y *F. benjamina* para su micropropagación (Deshpande *et al.* 1998 y Kumar *et al.* 1998).

De los tratamientos evaluados el método que mostró un eficiente proceso de germinación para las tres especies fue el uso de papel y, a su vez, este fue el que mejor facilitó la manipulación de las plantas para su trasplante; contrario a lo observado por Rai *et al.* (1988) en condiciones convencionales en estas especies de *Ficus*.

El mejor sustrato para el desarrollo de las plantas fue el de musgo, debido a que permite mantener la humedad por más tiempo y una buena aeración para el sistema radical de los higueros. Además, facilitó la transferencia de las plantas a tierra, ya que se evitó el rompimiento de las raíces.

En el sustrato de tierra se observó pérdida de humedad a los diez días y se incurrió en el riego de las plantas con más frecuencia. Asimismo, cuando se realizó la transferencia de las plantas a bolsas, se produjo rompimiento de las raíces. Con el sustrato de arena, el rompimiento de las raíces fue menor que con el de tierra.

En condiciones ambientales, la arena esterilizada mostró ser un buen sustrato para la germinación de las semillas de *F. morazaniensis*.

Aunque las plántulas germinadas en el recipiente sin sustrato presentaron la ventaja de estar más adaptadas a las condiciones de vivero, lo cual ahorra tiempo y trabajo, cuando se trasplantaron a bolsa, fueron las más susceptibles al ataque de insectos en la región del tallo y su crecimiento y desarrollo fueron más lentos comparados con las que crecieron en condiciones *in vitro* y *ex vitro-in vitro*. Razón por la cual, en algunos casos, hubo que plantar más de dos o tres plántulas por bolsa y posteriormente separarlas. La especie que mostró un porcentaje de germinación más constante en los diferentes tipos de sustrato fue *F. morazaniensis*.

La irrigación fue un factor fundamental en todas las etapas de producción de las tres especies de *Ficus* y los períodos de sequía en la etapa de germinación fueron esenciales para que fuera más homogénea. Todas las especies mostraron una gran viabilidad de las semillas y, de cierta forma, una latencia que se rompía con estos períodos de sequía y humedad. Es posible que las semillas colocadas en arena esterilizada bajo condiciones *in vitro* se vieran afectadas por la humedad constante que se mantiene bajo esas condiciones.

Otros aspectos a considerar fueron la respuesta favorable de las especies a la fertilización, así como las diferencias en crecimiento entre ellas. Al terminar el período de estudio, el crecimiento promedio en altura de las tres especies de *Ficus* en función del tiempo no muestra diferencias entre las tres especies, sin embargo, el crecimiento de *F. morazaniensis* fue más acelerado a partir de la segunda fertilización. En la etapa de vivero *F. jimenezii* siempre presentó un mayor crecimiento que las otras dos especies y no se recomienda tenerla más de ocho meses en esta etapa y a las otras especies no más de diez meses en bolsas.

Es recomendable pasar las plántulas a bolsas u otros recipientes en grupos, de forma que alcancen una mayor altura para su trasplante.

AGRADECIMIENTOS

A Jaime Víquez, propietario de la finca Los Inocentes Lodge y a Alan Journet por proveer el material de estudio.

REFERENCIAS

- Berg, C. 1990. Reproduction and evolution in *Ficus* (Moraceae): Traits Connected With The Adequate Rearing of Pollinators. *Memories of the New York Botanical Garden* 55:169-185.
- Burger, W. 1977. *Flora costaricensis*. Fieldiana: Botany. Museum of Natural History 40:90-167.
- Deshpande, S. R., P. C. Josekutty & G. Prathapasanen. 1998. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree *Ficus religiosa*. *Plant Cell Reports* 17:571-573.
- Journet, A. & K. Conway. 2001. Cultivating figs (*Ficus spp.*) to promote regeneration of a tropical moist forest in Guanacaste, Northwestern Costa Rica. Department of Biology. Southeast Missouri State University. Cape Girardeau. Restoration and Management Notes. 11 p.
- Kumar, V., A. Radha & S. Kumar Chitta. 1998. *In vitro* plant regeneration of fig (*Ficus carica* L. cv. gular) using apical buds from mature trees. *Plant Cell Reports* 17:717-720.
- Milton, K., D. Windsor & A. Morrison Stribi. 1982. Fruiting phenology of two Neotropical *Ficus* species. *Ecology* 63(3):752-762.
- Montero, J. L. 1991. Sincronización de la floración y maduración de los siconios de *Ficus jimenezii* Standl. (Moraceae) y su polinización por *Blastophaga jimenezii* (Hymenoptera: Agaonidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional. 44 p.
- Rai, S. N., H. C. Nagaveni *et al.* 1988. Germination and nursery technique of four species of *Ficus*. *Indian Forester* 114(2):63-68.
- Ramírez, B. 1977. A New Classification of *Ficus*. *Annual of Missouri Botanical Garden* 64:296-310.