

Propagación *in vitro* de *Vriesea* en sistemas de inmersión temporal

Iris Capote^{1*}, Maritza Escalona¹, Marcos Daquinta¹, Danilo Pina², Justo González¹, Carlos Aragon¹
*Autor para correspondencia.

¹Centro de Bioplantas, UNICA, Carretera a Morón, km 9 Ciego de Ávila.

²Laboratorio de Células y Cultivo Tejidos, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, CP 69 450, Cuba. e-mail: icapote@bioplantass.cu

RESUMEN

Las bromelias son plantas ornamentales muy atractivas por la coloración de sus hojas y la belleza de sus inflorescencias. Dentro de ellas *Vrieseas* es uno de los géneros de mayor interés comercial. Cuando se desean introducir nuevos híbridos en el mercado, las técnicas de propagación tradicional son insuficientes, por lo que resultan de gran interés las técnicas de propagación *in vitro*. Con el objetivo de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* en Biorreactores de Inmersión Temporal se determinó el efecto del paclobutrazol combinado con Kinetina y BA a diferentes frecuencias de inmersión en la proliferación y calidad de los brotes, y dos concentraciones de GA₃ en el crecimiento de los brotes. La integración de los resultados constituyen los procedimientos elementales para un protocolo de propagación de *Vriesea* con el empleo de la técnica de inmersión temporal.

Palabras clave: bromelias, ornamentales, paclobutrazol

ABSTRACT

Bromeliads are ornamentals plants very attractive due to leaves coloration and the beautiful inflorescences. *Vrieseas* is a genus of a great commercial interest among them. Traditional propagation techniques are limited to introduce new hybrids to market. Then, *in vitro* propagation technique gains a great interest. Effect of paclobutrazol combined with Kinetin and BA to different immersion frequency in shoots proliferation and quality, using two concentrations of GA₃ in shoots growth were evaluated to establish a protocol for *in vitro* propagation in Temporary Immersion Systems. Integration of these results is the elemental procedure for an *in vitro* propagation protocol of *Vriesea* using temporary immersion technique.

Key words: bromeliads, ornamentals, paclobutrazol

INTRODUCCIÓN

Las Bromelias se propagan de forma tanto natural a través de la vía sexual como de la asexual, pero ambas vías presentan problemas.

El desarrollo de las técnicas de micropropagación ha tenido resultados ventajosos en la propagación rápida y con calidad de genotipos élites. Los protocolos de propagación *in vitro* de las Bromelias se han establecidos a partir del cultivo de ápices, yemas axilares y explantes de hojas provenientes de plantas adultas (Pierik y Sprengles, 1991), del cultivo de plantas a partir de la germinación de las semillas *in vitro* (Mercier y Kerbauy, 1994; Alves y Guerra, 2001), y por la formación de yemas adventicias a partir

de la parte basal de las hojas removidas de cultivos asépticos (Carneiro *et al.*, 1999). Todos estos protocolos presentan como desventajas los bajos coeficientes de multiplicación, el alto costo de la mano de obra y la escasa posibilidad de automatización. Es por ello que se han venido desarrollando nuevos métodos de propagación con el empleo de medio de cultivo líquido.

Con el cultivo en inmersión temporal se aumenta la tasa de multiplicación y se mejora la calidad morfológica intrínseca de los brotes. La caracterización fisiológica de las plantas en esa nueva forma de cultivo ha demostrado una baja capacidad fotosintética *in vitro* y una mayor asimilación de nutrientes en el cultivo de piña (*Ananas comosus* L.) (Escalona *et al.*, 2003).

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de diferentes condiciones de cultivo en la propagación *in vitro* de la *Vriesea* en Sistemas de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas cultivadas *in vitro* de un híbrido de *Vriesea*, Bromelia Ornamental, proveniente del Laboratorio Comercial SBW de Holanda. Se utilizaron grupos de 2-3 brotes de los agregados, las hojas de los brotes se removieron y se cortaron a una altura de 1.5 cm desde la base.

El medio de cultivo fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado. Para todos los experimentos, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 previo a la esterilización por vapor de autoclave, 121°C y 118 kPa. El tiempo de esterilización estuvo en correspondencia con el volumen de medio de cultivo (Burger, 1988) que se empleó en cada caso.

Se emplearon Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) previamente descritos por Escalona *et al.* (1999). Las condiciones de cultivo en el estante de inmersión temporal fueron de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, un flujo de Fotones Fotosintéticos de $30\text{--}40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y un foto período de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

El coeficiente de multiplicación se determinó por el cociente del número final de brotes entre el número inicial de brotes que se inocularon. Como indicadores de calidad se cuantificó presencia de brotes hiperhídricos, coloración de los brotes. Se midió la longitud de los brotes, número de hojas por brote, número de raíces por brote, así como se determinó la masa fresca (g) y la masa seca (g). Para la determinación de la masa seca los brotes se colocaron durante 72 horas a 70°C en estufa de convección (HSA) hasta peso constante.

Efecto de Paclobutrazol (PBZ) y la frecuencia de inmersión

Se evaluaron dos factores: concentración de Paclobutrazol (0.0, 1.70, 3.40 y $5.10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PBZ) adicionado al medio de cultivo basal MS modificado y la frecuencia de inmersión (cada

una, tres y cinco horas) con el objetivo de evaluar el posible efecto sinérgico citoquininas-retardante del crecimiento en la proliferación de los brotes en BIT a diferentes frecuencias de inmersión.

Efecto de Bencil adenina (BA) y Paclobutrazol (PBZ)

Este experimento tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de BA y PBZ en la proliferación y calidad de los brotes de *Vriesea* tomando como base la mejor frecuencia de inmersión que se determinó en el experimento anterior.

Las condiciones experimentales fueron las mismas que se describieron en el experimento anterior. Como tiempo y frecuencia de inmersión se emplearon cuatro minutos cada tres horas.

Se ensayaron las siguientes concentraciones de BA: 0.0, 4.43 y $8.87 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Mara Alves y Guerra, 2001), así como las concentraciones de PBZ: 0.0, 0.4 y $0.85 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Daquinta *et al.*, 2001). Se empleó un tratamiento control que contenía la misma composición basal descrita anteriormente, pero se adicionaron $4.64 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de Kinetina y $0.53 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido naftalenacetico (ANA).

Efecto del ácido giberelico (AG_3) en el crecimiento de los brotes de *Vriesea* en el BIT

El objetivo de este experimento estuvo relacionado con lograr la elongación de los brotes. Para ello fue necesario ampliar la capacidad del BIT. Con ese propósito, se emplearon BIT de 1 000 ml. El tiempo de proliferación fue de ocho semanas. Para la fase de crecimiento en el BIT se establecieron tres tratamientos: MS (formulación completa Murashige y Skoog, 1962), MS con $2.02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AG_3 y MS con $4.05 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AG_3 .

Para el desarrollo de este experimento se tomaron brotes de *Vriesea* provenientes de medio de cultivo semi-sólido después de un sexto subcultivo los cuales se multiplicaron en el BIT según las condiciones experimentales descritas con anterioridad. En este caso para la proliferación de los brotes se empleó la mejor composición

determinada en el experimento anterior. El experimento contó con un total de tres tratamientos cada uno con tres repeticiones.

Después de quince días en la fase de crecimiento se evaluó el coeficiente de multiplicación. Para el análisis estadístico se utilizó el utilitario estadístico SPSS (versión 11.5 para Windows).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del Paclobutrazol y la frecuencia de inmersión

Al evaluar el efecto de la frecuencia de inmersión y diferentes concentraciones de PBZ adicionado al medio de cultivo durante la proliferación de la *Vriesea* en el BIT se encontró que la frecuencia de inmersión cada una y tres horas con la concentración de PBZ de $3.40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ aumentó significativamente el coeficiente de multiplicación después de las ocho semanas de cultivo. Se alcanzaron valores de 3.14 y 3.45 respectivamente (Tabla 1). De forma general, para cada frecuencia de inmersión a esta concentración de PBZ ($3.40 \mu\text{mol.l}^{-1}$) **se la formación de brotes**. La frecuencia de inmersión cada tres

horas aumentó significativamente los indicadores de calidad de los brotes como fue el número de hojas/brote independientemente de la concentración de PBZ. Solo el tratamiento control a esa misma frecuencia de inmersión logró aumentar significativamente la longitud de los brotes a 4 cm (Tabla 1).

En el cultivo en inmersión temporal, la frecuencia de inmersión es uno de los factores que tiene mayor incidencia en la respuesta morfogénica de los explantes ya que es el proceso mediante el cual los explantes se ponen en contacto con el medio de cultivo líquido y de esa forma se toman los nutrientes, se logra la aireación e intercambio gaseoso del vaso de cultivo y se regula el nivel de hiperhidricidad de los brotes.

Es bien conocido que los retardantes del crecimiento tales como el PBZ, bloquean la biosíntesis de las giberelinas a través de la inhibición competitiva de la enzima P450 mono-oxigenasa, la cual cataliza las reacciones de oxidación que conducen a la formación del ent-kaurenoico a partir del ent-kaureno (Rademacher, 2000).

Tabla 1. Efecto de la frecuencia de inmersión y la concentración de PBZ en el coeficiente e multiplicación y la calidad de los brotes de *Vriesea* en el BIT.

Frecuencia de inmersión (h)	Concentración de PBZ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Coeficiente de Multiplicación	Longitud de los brotes (cm)	Número de hojas/brote
1	0.0	1.5 cde	2.8 d	11.3 cd
	1.70	1.9 cd	3.4 bc	11.5 bcd
	3.40	3.1 a	3.1 cd	9.3 d
	5.10	1.5 cde	3.0 cd	10.9 d
3	0.0	1.7 cde	4.0 a	12.8 a
	1.70	1.9 cd	3.6 b	12.6 ab
	3.40	3.5 a	3.4 bc	12.4 ab
	5.10	1.4 e	3.1 cd	13.0 a
5	0.0	1.4 cde	3.0 cd	12.3 abc
	1.70	1.9 c	3.2 cd	12.4 abc
	3.40	2.4 b	3.2 cd	10.7 d
	5.10	1.9 cde	3.1 cd	10.7 d
Sig.		*	*	*

Los datos representan la media de tres repeticiones (tres BIT/tratamiento). Kruskal-Wallis $p \leq 0.05$. Medias con letras diferentes indican significación por la prueba de Student-Newman-Keuls.

En la proliferación de los brotes de *Vriesea* se logró un efecto combinado entre la frecuencia y la concentración de $3.40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de PBZ en el medio de cultivo con Kinetina-ANA, incluso a la misma frecuencia (cada tres horas) que se ensayó en experimentos anteriores (datos no presentados). Este resultado puede ser indicativo de que la adición de PBZ al medio de cultivo logró un efecto sinérgico con la citoquinina y favoreció la proliferación de los brotes. Es decir, que en la adición de PBZ inhibió la síntesis de giberelinas y como consecuencia, las citoquininas pueden manifestar su potencial inductor en la formación de brotes (Werbrouck, *et al.*, 1996).

De los indicadores morfológicos que se evaluaron, una vez más la inmersión cada tres horas logró un aumento significativo en el número de hojas de los brotes independientemente de la concentraciones de PBZ. La ventaja de la inmersión temporal radica en que en esta técnica se combinan la ventilación de los tejidos de las plantas y el contacto intermitente entre la superficie del tejido y el medio de cultivo líquido (Etienne y Berthouly, 2002). Se favoreció un aumento en el número de hojas y en la longitud de los brotes en el tratamiento donde el PBZ estuvo ausente.

Como resultado de este experimento se seleccionó la frecuencia de cada tres horas para continuar con el cultivo en inmersión

temporal y evaluar otros factores que elevaron la eficiencia biológica en esta especie de planta.

Si bien es cierto que bajo las condiciones que se experimentaron se logró aumentar la proliferación de los brotes en el BIT, los niveles de proliferación que se alcanzaron fueron bajos en relación con los ya informados para otras especies de plantas y en particular para otras Bromelias ornamentales. Es por ello que se decidió evaluar las concentraciones de BA en combinación con PBZ, pero a las concentraciones que previamente establecieron Daquinta *et al.* (2001).

Efecto de la concentraciones de Bencil adenina (BA) y Paclobutrazol (PBZ)

Al evaluar el efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BA y PBZ en la proliferación y calidad de los brotes de *Vriesea* en BIT, se observó que las concentraciones de 4.43 y $8.87 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de BA con la mayor concentración de PBZ ($0.85 \mu\text{mol.l}^{-1}$) aumentó significativamente el coeficiente de multiplicación en un rango de 3.6 y 3.9 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la longitud promedio de los brotes y solo BA a $8.87 \mu\text{mol.l}^{-1}$ incrementó el número de hojas por brote (11.1) (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la concentración de BA y PBZ en el coeficiente de multiplicación y calidad de los brotes de *Vriesea* después de ocho semanas de proliferación en el BIT.

Concentración de BA ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Concentración de PBZ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	CM	Longitud promedio de los brotes (cm)	Número de hojas/brote
0.0	0.0	2.9 b	3.13	8.7 bc
	0.40	2.6 bc	3.13	9.6 b
	0.85	2.5 bc	2.52	8.2 c
4.43	0.0	1.6 d	2.65	8.0 c
	0.40	1.9 cd	2.77	8.8 bc
	0.85	3.6 a	2.66	9.2 bc
8.87	0.0	2.7 bc	2.80	11.1 a
	0.40	1.9 cd	2.70	9.1 bc
	0.85	3.9 a	2.31	9.6 b
Significación		*	NS	*

Los datos representan la media de tres repeticiones (tres BIT/tratamiento). Kruskal-Wallis $p < 0.05$. Medias con letras diferentes indican significación por el Student-Newman-Keuls. El tratamiento control (sin BA) se corresponde con el medio de cultivo MS modificado ($4.64 \mu\text{mol.l}^{-1}$ Kinetina y $0.53 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ANA).

El efecto de las citoquininas en el cultivo de tejidos u órganos puede variar en dependencia al tipo de compuesto que se utilice, el tipo de cultivo, la variedad de planta y si el explante proviene de un tejido juvenil o maduro (George, 1993).

En comparación con el empleo de Kinetina (control), las dos concentraciones de BA que se aplicaron lograron aumentar la proliferación de los brotes sólo cuando estas se combinaron con la mayor concentración de PBZ. Atendiendo a lo discutido anteriormente sobre la interacción citoquinina-PBZ, es evidente que la inhibición de la síntesis de giberelinas es aún más necesaria cuando BA actúa como inductor de la brotación en *Vriesea*, que cuando se utiliza Kinetina. Por ello hubiera sido interesante evaluar concentraciones de PBZ más altas en combinación con la BA, aspecto este a abordar en futuros experimentos.

Con la máxima concentración de BA sin PBZ lograron brotes con un mayor número de hojas, lo cual es indicativo de una mayor calidad en esta especie de plantas.

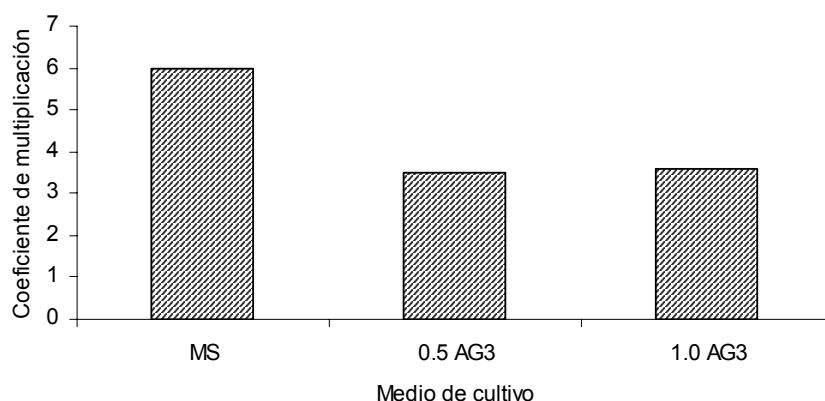
Como resultado de este experimento se decidió emplear para la proliferación de *Vriesea* en BIT la concentración de 8.87 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ BA y 0.85 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de PBZ añadidos al medio de cultivo MS modificado (sin Kinetina y con 0.44 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ANA). Sin embargo, con el objetivo de aumentar la longitud de los brotes previo a la fase de

enraizamiento *ex vitro* y aclimatización se procedió a determinar el efecto de dos concentraciones de AG_3 durante la fase de crecimiento en el BIT.

Efecto del AG_3 en el crecimiento de los brotes de *Vriesea* en el BIT

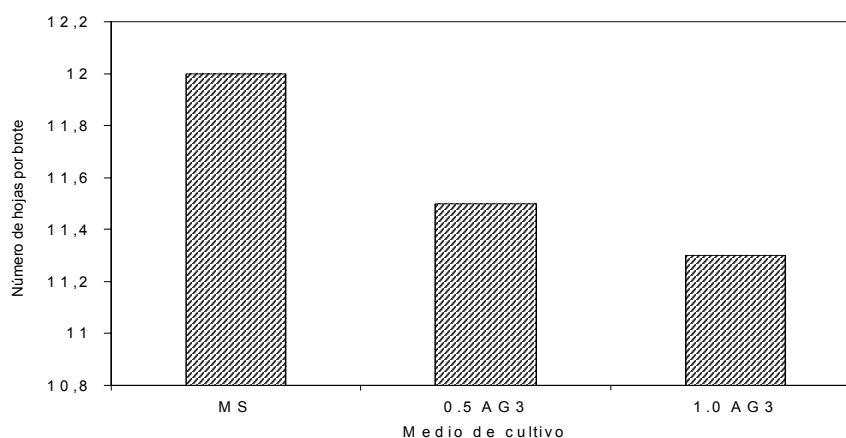
Al analizar el efecto de dos concentraciones de AG_3 en la fase de crecimiento de los brotes de *Vriesea* en el BIT, después de ocho semanas de proliferación, se determinó que los brotes que crecieron en el medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento lograron aumentar significativamente su capacidad morfogénica y alcanzaron un coeficiente de multiplicación de 5.9 en comparación con los tratamientos donde se empleó AG_3 (Figura 1). Sin embargo, el AG_3 provocó un aumento significativo en la longitud de los brotes y no se encontraron diferencias significativas entre ambas concentraciones. Además, el número de hojas por brote fue elevado y tampoco se comprobaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2).

Cuando el AG_3 se adiciona a los medios de cultivo de plantas, este frecuentemente produce efectos similares a las auxinas. Los brotes que reciben el efecto del AG_3 incrementan la longitud. En varias plantas, el uso de giberelinas en el medio de cultivo de brotes no es favorable ya que produce brotes elongados con hojas muy estrechas (George, 1993).



Kruskal-Wallis $p \leq 0.05$. Medias con letras diferentes indican significación por el Student-Newman-Keuls.

Figura 1. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación de brotes de *Vriesea* después de ocho semanas de proliferación y quince días posteriores de elongación en el propio BIT. Los datos representan la media de tres BIT/tratamiento.



Anova $p \leq 0.05$. Medias con letras diferentes indican significación por Tukey.

Figura 2. Indicadores morfológicos de calidad de brotes de *Vriesea* después de ocho semanas de proliferación y quince días de elongación en el propio BIT. Los datos representan la media de tres BIT/tratamiento en el que fueron evaluados todos los brotes.

En el cultivo *in vitro* de *Vriesea friburgensis* se ha empleado el AG₃ para lograr la conversión sincrónica de las microyemas a brotes. El medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento o con AG₃ resultó en la diferenciación y desarrollo de brotes múltiples a partir de las multiyemas (Alves y Guerra, 2001).

También el AG₃ ha sido utilizado en estudios de la composición del medio de cultivo en la germinación de semillas *in vitro* y en el ulterior desarrollo de las plántulas. Cuando se comparó el efecto del ANA y el AG₃ a la concentración de 4.05 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ en el medio de cultivo basal Knudson, este último regulador promovió la germinación de *Vriesea splendens* mientras que el ANA estimuló el desarrollo temprano de las plántulas (Mercier y Kerbauy, 1997).

De los resultados del presente experimento resulta interesante destacar que el subcultivo de los brotes de *Vriesea* en el BIT en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento provocó un incremento significativo de su capacidad morfogénica. De allí que pudiera inferirse de que los brotes de *Vriesea* requieren de un proceso de no exposición al efecto de las citoquininas para la formación de nuevos brotes. En las Bromelias, los meristemos intercalares distribuidos en la base de las hojas tiene un alto potencial para la formación de yemas. Es por ello que la capacidad morfogénica de algunas especies deba estar muy relacionada con la capacidad inductiva del tipo de regulador que

se aplique y el balance endógeno que se logre (Mercier y Kerbauy, 1997).

CONCLUSIONES

Se determinó que las condiciones de cultivo influyeron en la propagación *in vitro* de *Vriesea* en Sistemas de Inmersión Temporal, especialmente las concentraciones de los reguladores de crecimiento empleados y la frecuencia de inmersión. La integración de los resultados constituyen los procedimientos elementales para un protocolo de propagación de *Vriesea* con el empleo de la técnica de inmersión temporal.

REFERENCIAS

- Alves, M, Guerra P (2001) Micropropagation for Mass Propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* Var. paludosa from microbuds. Journal of the Bromeliad Society 51(5): 202-212
- Carneiro, LA, Arujo RF, Brito GJM, Fonseca MHPB, Costa A, Crocomo OJY, Mansur E (1999) *In vitro* regeneration from leaf of *Neorgelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smit, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55: 79-83
- Daquinta, M, Espinosa P, Escalona M, Rodriguez R, Guerra M (2001) Bromeliad micropropagation in Temporary Immersion System. Journal of the Bromeliad Society 51 (2): 80-85
- Escalona, M, Lorenzo JC, Gonzalez B, Daquinta M, Gonzalez JL, Dejardins Y, Borroto CG (1999)

- Pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18 (9): 723-748
- Etienne, H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215–231
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1. 2da Edition. *Exergetics* 1. Springe
- Mercier, H, Kerbauy GB (1994) *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of the Bromeliad Society* 44: 120-124
- Mercier, H, Kerbauy GB (1997) Micropropagation of ornamental Bromeliads (*Bromeliaceae*). En: YPS Bajaj (ed) . *Biotechnology in agricultura and forestry*, vol. 40: Hihh-Tech. and Micropropagation VI pp.43-57. Spriger Verlag. Dordrecht
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-487
- Pierik, RLM, Sprengels PA (1991) Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. *Journal of the Bromeliad Society* 41: 9-12
- Rademacher W (2000) Growth retardants: effects on gibberellins biosynthesis and other metabolic pathways
- Werbrouck SPO, Strnad M, Van Onckelen H, Debergh PC (1996) Gibberellins play a role in the interaction between imidazole fungicides and cytokinins in *Areaceae*. *Journal of Plant Regulator*. 15: 87-93