

## Multiplicación *in vitro* de *Paeonias* sp. variedad 'SeSu' en Sistemas de Inmersión Temporal

Yarriane Lezcano\*, Maritza Escalona, Marcos Daquinta \*Autor para correspondencia

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

### RESUMEN

Las *Paeonias* son consideradas entre las ornamentales perennes más importantes. Con vistas a aumentar los coeficientes de multiplicación *in vitro* de *Paeonias* sp. var. SeSu, se determinó la influencia de tres métodos de cultivo (en medio de cultivo semi-sólido, medio de cultivo líquido estático y en medio de cultivo líquido por inmersión temporal) así como tipo y concentración de citoquininas. Se comprobó que el cultivo en inmersión temporal incrementó significativamente el coeficiente de multiplicación a medida que aumentó la concentración de benziladenina y se alcanzó el máximo valor a la concentración de 6.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Se demostró que tanto el tipo como la concentración de citoquininas tuvieron efecto en la multiplicación de *Paeonia* var. SeSu en inmersión temporal. Los mayores coeficientes de multiplicación se encontraron con las concentraciones de 4.44 y 6.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$  de meta-topolina y 6.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$  de BA, sin diferencias significativas entre ellos. Ambas citoquininas mejoraron la longitud del brote principal y no se observaron brotes hiperhídricos.

Palabras clave: citoquininas, ornamentales, proliferación

### ABSTRACT

*Paeonia* are considered among the most important perennial ornamentals. The influence of three culture methods (semi-solid culture medium, static liquid culture medium and liquid culture medium by temporary immersion) as well as the type and concentration of cytokinins was investigated to improve the coefficients of *in vitro* multiplication of *Paeonia* sp. var. 'SeSu'. Results demonstrated that temporary immersion increased significantly the multiplication coefficient by increasing the concentration of benzyladenine. A maximum concentration value of 6.66  $\text{mmol l}^{-1}$  was reached. Both, type and concentration of cytokinins had effect on the multiplication of *Paeonia* var. SESu in its temporary immersion. The highest rates of multiplication were achieved with concentrations of 4.44 and 6.66  $\text{mmol l}^{-1}$  meta-topolin and 6.66  $\text{mmol l}^{-1}$  BA, without significant differences between them. Both cytokinins enhanced the shoot length. Hyperhydric shoots were not found.

Key words: cytokinins, ornamentals, proliferation

### INTRODUCCIÓN

La familia *Ranunculaceas* incluye numerosas plantas ornamentales cultivadas en jardinería. Entre ellas se encuentran los géneros: *Paeonia*, *Ranunculos*, *Aquilegia*, *Nigella*, *Delphinium*, *Anemone*, *Clematis*, etc. Otras especies se emplean en medicina como revulsivas (*Ranunculos sceleratus*), como insecticidas (*Delphinium staphisagria*), o por la importancia farmacológica de los principios activos que contienen, como ocurre con el aconito (*Aconitum napellus*), de los Alpes, Pirineos y otras montañas europeas y el adonis (*Adonis vernalis*) (Gola y Cappelletti, 1969).

Son consideradas entre las ornamentales perennes más importantes. Se propagan de manera vegetativa a través de la división del rizoma o de la corona de la planta. Por esta vía sólo es posible obtener de tres a cinco clones por año (Hosoki *et al.*, 1989) y la tasa de multiplicación es muy lenta para satisfacer las demandas de producción de cultivares populares así como la introducción de nuevas especies e híbridos.

Las paeonias no producen raíces adventicias fácilmente. El injerto es uno de los métodos que se aplican comercialmente para su propagación asexual y las estacas pueden formar su propio sistema radical sólo después

de uno o dos años de ser injertadas sobre rizoma de paeonias herbáceas (Bouza *et al.*, 1994).

Las técnicas de cultivo de tejidos como la formación de callos a partir de yemas florales y de embriones de semilla han sido implementadas sin éxito en la regeneración de plantas de *Paeonia*. Sin embargo, se ha informado sobre la propagación adventicia utilizando filamentos y pétalos como explantes. Se describe, además, el desarrollo y regeneración de callos después de ocho semanas en medios de cultivo con tiazurón (TDZ) (Beruto *et al.*, 2004).

Se conoce que con el uso de Sistemas de Inmersión Temporal la morfología y el comportamiento fisiológico de los brotes son muy semejantes a los que presentan las plantas en condiciones *ex vitro*, debido entre otras cosas al mejoramiento de la atmósfera del sistema (Teisson y Alvard, 1999). Sin embargo, la implementación de esta técnica en la propagación de paeonias necesita investigarse con mayor detalle y de esta forma lograr la optimización de para su explotación a escala comercial.

El objetivo de este trabajo fue multiplicar *in vitro* *Paeonia* sp. variedad 'SeSu' en Sistemas de Inmersión Temporal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila.

Como material vegetal se emplearon plantas de paeonias híbridas oriunda de China. La variedad en estudio fue 'SeSu' (Sequestered Sunshine).

El medio de cultivo basal para la propagación fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) enriquecido con 440 mg l<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 2.22 μmol l<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) y 1.44 μmol l<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 antes de su esterilización.

Los cultivos de paeonias en el medio de cultivo semisólido se incubaron en cuartos de cultivo

a 25 ± 2.0°C, bajo luz blanca fluorescente (30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Se emplearon SIT previamente descritos por Escalona *et al.* (1999). El volumen de medio de cultivo líquido que se adicionó al SIT fue de 300 ml (50 ml/explante). Se inocularon seis explantes por SIT. Un explante se definió como un brote con hojas de 3 a 4 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro. La duración de la fase de multiplicación fue de cinco semanas.

Las condiciones de cultivo en el estante de inmersión temporal fueron de 25 ± 2°C, iluminación de 30-40 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad.

## Influencia del método de cultivo y la concentración de Benciladenina (BA)

Se comparó la influencia de tres métodos de cultivo (en medio de cultivo semisólido, medio de cultivo líquido estático y en medio de cultivo líquido por inmersión temporal) sobre el coeficiente de multiplicación y la calidad de los brotes.

Se emplearon frascos de vidrio (Mason Jar) de 1000 ml de capacidad. En todos los tratamientos se utilizó un volumen de medio de cultivo de 300 ml. Como agente gelificante se empleó el Gelrite a 2.5 g l<sup>-1</sup>. En el cultivo en medio líquido, se empleó un soporte de papel de filtro para evitar el hundimiento de los brotes. Se ensayaron las siguientes concentraciones de BA (0, 2.22, 4.44 y 6.66 μmol l<sup>-1</sup>) añadidas al medio de cultivo basal MS descrito anteriormente. El experimento contó con 12 tratamientos cada uno con tres repeticiones. En el cultivo en inmersión temporal se empleó una frecuencia de inmersión de cuatro minutos cada ocho horas.

A las cinco semanas de cultivo se calculó el coeficiente de multiplicación como el cociente del número final de brotes entre el número inicial (un brote de 3-4 cm de longitud y un diámetro mayor de 0.5 cm) inoculados. De igual forma se determinaron los indicadores morfológicos longitud (cm) y número de hojas por brote del brote principal, así como se cuantificó el número de brotes hiperhídricos. Finalmente, se seleccionó el método de cultivo donde se obtuvieran los mayores valores de las variables referidas a la calidad de los brotes.

## Efecto del tipo y concentración de citoquininas

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de dos citoquininas sobre la multiplicación *in vitro* de esta variedad.

Se ensayaron dos tipos de citoquininas aromáticas, 6-Benciladenina (BA) y metatopolina (mT) [N<sup>6</sup>- (3-hidroxybenzyl) adenina], a las siguientes concentraciones 0.0, 2.22, 4.44 y 6.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$ .

Las condiciones experimentales fueron las mismas que se describieron en el experimento anterior para el cultivo en los SIT. Se inocularon seis explantes en cada SIT. La frecuencia de inmersión fue de cuatro minutos cada ocho horas. A las cinco semanas de cultivo se calculó el coeficiente de multiplicación y se evaluó la calidad del brote principal como se describió anteriormente. El experimento contó con ocho tratamientos cada uno con tres repeticiones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Influencia del método de cultivo y la concentración de Benciladenina (BA)

Al comparar las diferentes formas de cultivo (semisólido, líquido estático e inmersión temporal) con las diferentes concentraciones de BA se comprobó que el cultivo en inmersión temporal incrementó significativamente el coeficiente de multiplicación a medida que aumentó la concentración de citoquinina y se alcanzó el máximo valor con 6.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (6.8). No se encontraron diferencias significativas entre el cultivo en medio semisólido y líquido a las diferentes concentraciones de BA.

En cuanto a los indicadores morfológicos de calidad, el cultivo en inmersión temporal aumentó significativamente la longitud del brote principal y no se encontraron diferencias en el número de hojas por brote entre los diferentes tratamientos. Sin embargo, los brotes que se cultivaron en medio de cultivo líquido estático con 2.22  $\mu\text{mol l}^{-1}$  de BA fueron los que menor número de hojas presentaron (Figura 1).

La efectividad del cultivo en inmersión temporal sobre la multiplicación y calidad de

los brotes ha sido demostrada en diferentes especies de plantas (Etienne y Berthouly, 2002). Dentro de las ventajas que ofrece está que el contacto directo con el medio de cultivo renovado durante cada inmersión garantiza una forma más eficiente de suministro de los nutrientes en comparación con el cultivo convencional (semisólido y líquido). Por otra parte, los tiempos de inmersión son cortos, la mayoría del tiempo los explantes están recubiertos de una película de medio líquido y de esta forma se evita su desecación. La resistencia a la difusión de gases es baja y existe una mínima ruptura del intercambio gaseoso entre los tejidos y la atmósfera, por esta razón dentro del vaso de cultivo se renueva el ambiente gaseoso, en intervalos regulares de tiempo. Además, la agitación por el flujo de aire durante la fase de inmersión causa expansión de los tejidos y se facilita un mayor contacto de éstos con el medio de cultivo (Teisson y Alvard, 1995).

Lorenzo *et al.* (1998), demostraron en variedades de *Saccharum* spp., que el cultivo en inmersión temporal estimuló la formación de brotes y su longitud. La tasa de multiplicación fue seis veces mayor que la obtenida en los protocolos convencionales. Resultados similares fueron obtenidos por Escalona *et al.* (1999) en el cultivo de *Ananas comosus* utilizando el mismo Sistema de Inmersión Temporal. En este cultivo, la inmersión temporal estimuló la formación de brotes, conjuntamente con la masa fresca y seca. Igualmente, Roels *et al.* (2006) lograron con el empleo de los SIT aumentar la tasa de multiplicación, así como la calidad morfológica de los brotes en el plátano 'CEMSA 3/4'.

En la propagación de otras plantas ornamentales tales como *Phalaenopsis* se han logrado tasas de multiplicación de 25 en 12 semanas a partir de la inoculación de 70 brotes de 20 g de masa fresca en un Sistema de Inmersión Temporal de cinco litros de capacidad (Preil y Hempfling, 2002).

También en la micropropagación de *Crescentia cujete*, las plantas que crecieron en el biorreactor de inmersión temporal incrementaron la biomasa, el número de hojas, la altura de los brotes y se logró una mayor eficiencia en el trasplante a condiciones *ex vitro* (Murch *et al.*, 2004).

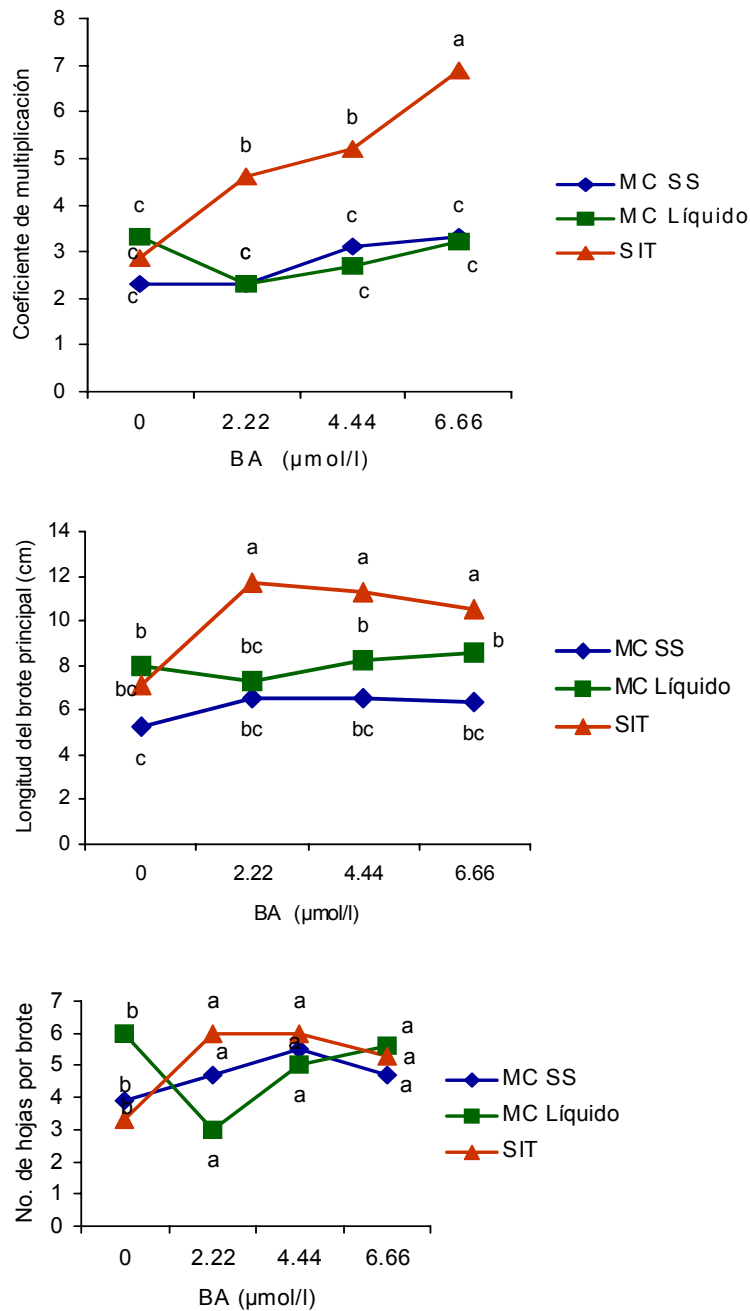


Figura 1. Efecto de la concentración de BA y el método de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación y la calidad morfológica de brotes de *Paeonia* var. 'SeSu'. La media representa los datos de tres repeticiones. Kruskal-Wallis  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican significación por la prueba de Student-Newman-Keuls. MC SS: medio de cultivo semisólido, MC Líquido: medio de cultivo líquido estático, SIT: sistemas de inmersión temporal

La alta tasa de multiplicación que se obtuvo con la aplicación de la inmersión temporal en comparación con las de cultivo convencionales para la multiplicación de *Paeonia* var. 'SeSu', está en correspondencia con lo ya anteriormente informado para otros cultivos. Los explantes se desarrollaron como agregados de brotes axilares

y no se observó la presencia de brotes adventicios ni brotes hiperhídricos (Figura 2).

La acumulación de agua en los tejidos apoplásticos de los brotes, desorden fisiológico conocido como hiperhidricidad, es uno de los problemas que está asociado al uso del medio

de cultivo líquido. Sin embargo, este puede ser eliminado con el empleo de la técnica de inmersión temporal y/o ajustada a través del tiempo y la frecuencia de inmersión (Etienne y Berthouly, 2002).

El coeficiente de multiplicación que se alcanzó con el cultivo en inmersión temporal en esta variedad de *Paeonia* es superior a la que normalmente se logra con el empleo de medio de cultivo semisólido, donde la tasa de multiplicación ha oscilado entre 1.3 a 2.9 después de siete semanas a 15°C (Albers y Kunneman, 1992). Estos autores informaron la incapacidad de mejorar la tasa de multiplicación después de ensayar diferentes factores como la temperatura, tipo y concentración de citoquinina, uso de carbón activado, contenido de azúcares, tratamiento al frío y el empleo del medio líquido.

La concentración de BA también influyó de manera positiva en la proliferación de *Paeonia* var. SeSu con el uso de SIT. De manera general, esta citoquinina ha sido empleada a concentraciones bajas, que oscilan entre 2.22 y 4.44  $\mu\text{mol l}^{-1}$  en el medio de cultivo semisólido (Albers y Kunneman, 1992; Beruto *et al.*, 2004). El empleo de bajas concentraciones de esa citoquinina ha estado influenciado por el efecto que la misma provoca en la hiperhidricidad de los brotes (Beruto *et al.*, 2004). En este trabajo no se encontraron síntomas de hiperhidricidad en los brotes.

Es por ello que se selecciona el cultivo en inmersión temporal como el método de cultivo para evaluar otros indicadores con vistas a incrementar la tasa de multiplicación y la calidad de las plantas de *Paeonia* var 'SeSu'.

### Efecto del tipo y concentración de citoquininas

Al comparar el efecto del tipo y concentración de citoquininas en la propagación de *Paeonia* var. SeSu en el cultivo en inmersión temporal, los mayores coeficientes de multiplicación se encontraron con las concentraciones de 4.44 y 6.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$  de meta-topolina y 6.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$  de BA, sin diferencias significativas entre ellos. Esta variable estuvo por encima de 5.0 y a la mayor concentración de citoquinina (6.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) se elevó hasta 6.8. Ambas citoquininas mejoraron la longitud del brote principal. Con relación al número de hojas por brote la mayor concentración de BA disminuyó significativamente este indicador morfológico (Figura 3). En cuanto a la longitud del brote principal no se encontraron diferencias significativas entre las dos citoquininas estudiadas, a las diferentes concentraciones evaluadas. No se encontraron síntomas de hiperhidricidad en los brotes. En presencia de BA se eliminó el callo en la base de los brotes. Sin embargo, con 2.22  $\mu\text{mol l}^{-1}$  se presentaron brotes con desarrollo anormal de las hojas.



Figura 2. Brotes de *Paeonia* var. 'SeSu' después de cinco semanas de cultivo en Sistema de Inmersión Temporal.

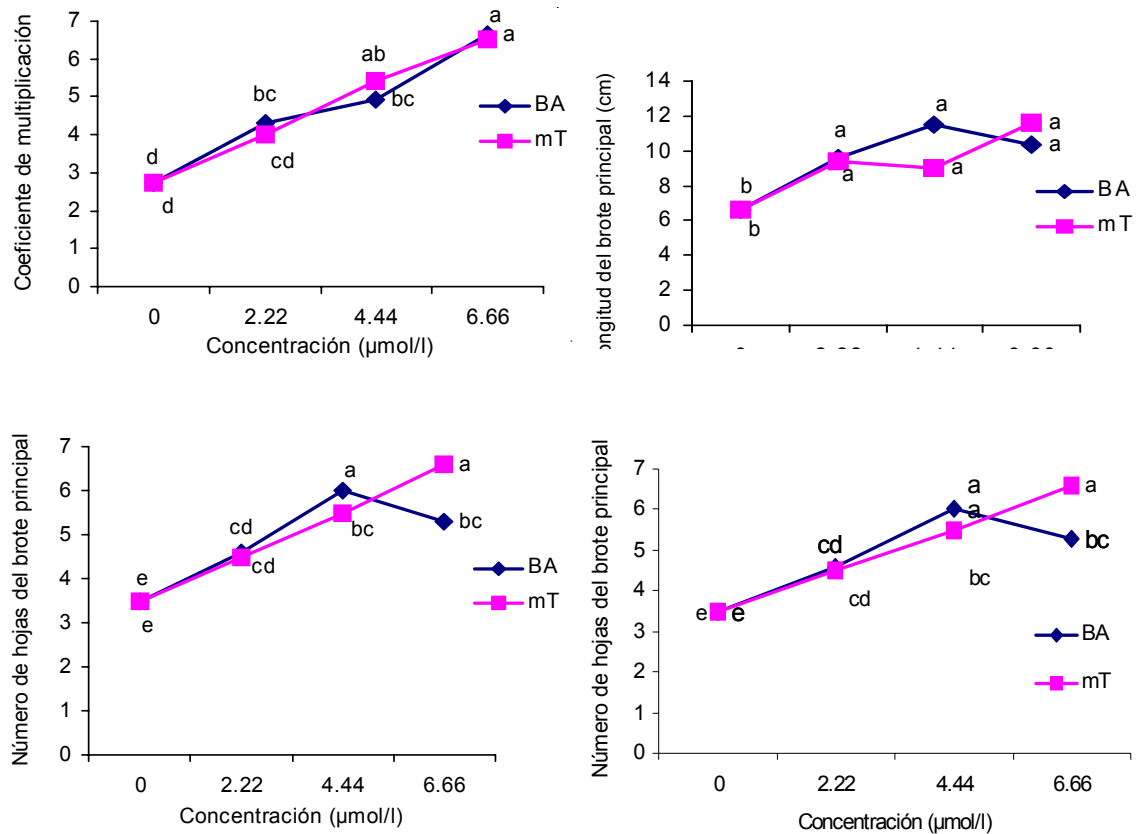


Figura 3: Efecto del tipo y concentración de citoquininas sobre el coeficiente de multiplicación y morfología de brotes de *Paeonia* var. SeSu después de cinco semanas de cultivo en el SIT. Las medias son el resultado de tres repeticiones. Kruskal-Wallis  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican significación por Student-Newman-Keuls. BA: benciladenina, mt: meta-topolina.

Diferentes requerimientos de reguladores del crecimiento han sido formulados para la propagación *in vitro* de especies de peonias y entre ellos, BA ha sido la principal citoquinina que ha sido empleada a concentraciones inferiores a  $4.44 \mu\text{mol l}^{-1}$  para estimular la multiplicación axilar de los brotes.

Bouza *et al.* (1994) evaluaron el efecto de diferentes tratamientos reguladores del crecimiento durante la multiplicación *in vitro* de la *Paeonia* French (Mme de Vatir) y lograron una tasa de multiplicación de 2.9 y un 30% de brotes hiperhídricos después de 25 semanas en el medio de cultivo MS con doble concentración de calcio y una concentración de BA de  $4.44 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

Otros autores como Hosoki *et al.* (1989) emplearon BA a  $4.44 \mu\text{mol l}^{-1}$ , pero en combinación con  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido giberélico para promover la formación de brotes axilares en una paeonia herbácea (*Paeonia lactiflora* Pall). Estos investigadores informaron una tasa

de multiplicación de 2.4 con la aplicación además de cortes longitudinales de los brotes.

La Meta-topolina (mT) es una citoquinina aromática que ha sido empleada en la propagación *in vitro* de diferentes especies de plantas, fundamentalmente de tipo ornamental. Recientemente ha sido informada su efectividad en la propagación de plátano CEMSA 3/4 (*Musa* AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal al ser comparada con otras citoquininas como BA y TDZ (Roels *et al.*, 2006).

El cultivo en inmersión temporal permitió el uso de citoquininas como BA y mT a concentraciones superiores a las empleadas con el uso del medio semisólido. Es decir que concentraciones de  $4.44$  y  $6.66 \mu\text{mol l}^{-1}$  lograron incrementar el coeficiente de multiplicación de los brotes de *Paeonia* var. 'SeSu' sin presencia de brotes hiperhídricos. Es evidente que en la capacidad morfogénica de los brotes no solo influye el tipo y concentración del regulador de



crecimiento, sino las propias condiciones ambientales del cultivo. El tipo de sistema de inmersión temporal que se utilizó en la proliferación de esta planta, en su diseño usa la ventilación forzada, lo cual conduce a la completa renovación de la atmósfera del frasco de cultivo en cada inmersión (Etienne y Berthouly, 2002). La ventilación del frasco de cultivo no solo puede reducir la humedad relativa sino que estimula la transpiración de los brotes, lo cual se traduce en una mayor proliferación y calidad.

La meta-topolina ha sido muy efectiva en la micropropagación de brotes de *Spathiphyllum floribondum* y se ha informado que elimina los principales problemas asociados al empleo de BA. El principal compuesto derivado de la BA, el 9-glucósido de Bencil adenina, se acumula en la base de los brotes y causa diferentes problemas en la aclimatización de estas plantas, tales como heterogeneidad en el crecimiento e inhibición de la formación de raíces (Werbrouck *et al.*, 1996).

En la proliferación de la *Paeonia* var. SeSu el empleo de meta-topolina logró el mismo efecto sobre la brotación axilar que BA. Sin embargo, promovió la formación de callo en la base de los brotes, lo cual pudiera tener un efecto desfavorable para la ulterior formación de raíces en esta planta. Es por ello, que se decidió seleccionar BA a la concentración de  $6.66 \mu\text{mol l}^{-1}$  como base para la multiplicación de esta especie en el Sistema de Inmersión Temporal.

## REFERENCIAS

- Albers, MRJ, Kunneman BPAM (1992) Micropropagation of *Paeonia*. Acta Horticulturae 314: 85-92
- Beruto, M, Debergh P (2004) Micropropagation of *Ranunculus asiaticus*: A review and perspectives. Plant Cell, Tissue and Organ culture 77:221-230
- Beruto M, Portogallo C (2004) Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 249-255
- Bouza, L, Jacques M, Sotta B, Migniac E (1994) Relations between auxin and cytokinin contents and *in vitro* rooting of tree Peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) Plant Growth Regulation 15: 69-73
- Bouza, L, Jacques M, Sotta B, Migniac E (1994) *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv Mme de Vatry developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase. Science Horticulturae 58: 223-233
- Burger, DW (1988) Guideline for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. HortScience 23(6): 1066-1068
- 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: 743-748
- Etienne, H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ culture 69: 215-231
- Gola, G, Cappelletti C (1969) Tratado de Botánica. Editorial Revolucionaria. La Habana.
- Hosoki, T, Ando M, Kubara T, Hamada M, Itami M (1989) *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method. Plant Cell Reports 8: 243-246
- Lorenzo, JC, Gonzalez B, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto CG (1998) Sugar cane shoots formation in an improved Temporary Immersion System. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54 (3): 197-200
- Murch, JS, Liu C, Romero MR, Saxena KP (2004) *In vitro* culture and Temporary Immersion Bioreactor production of *Crescentia cujete*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 63-68
- Preil, W, Hempfling T (2002) Application of Temporary Immersion System in propagation of *Phalaenopsis*. First International Symposium on liquid systems for *in vitro* mass propagation of plants. p 47. As. Norway
- Roels S, Escalona M, Cejas I, Rodriguez R, Canal MJ, Sandoval J, Debergh P (2006) Optimisation of the multiplication of plantain (*Musa AAB*) in a Temporary Immersion Bioreactor. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 210-214
- Teisson, C y Alvard D (1995) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Immersion. En: Terzi, M, Cella, R, Falavigna A (eds). Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, pp. 105-109. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Teisson, C, Alvard D (1999) *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. Potato Res. 42: 499-504
- Werbrouck, SPO, Strnad M, Van Onckelen H, Debergh PC (1996) Gibberellins play a role in the interaction between imidazole fungicides and cytokinins in *Areacea*. Journal of Plant Regulators 15: 87-93