

Micropropagación de *Gerbera jamesonii* H. Bolus

Pablo Machado Armas^{1*}, Daniel Agramante Peñalver², Nelly Almanza Sánchez¹, Drialys Díaz Sánchez¹, Leiny Gómez Fleites¹. *Autor para correspondencia.

¹ Biofábrica de las Flores, Desvío del Reparto Universitario Km. 2 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. Tel. 281290.

² Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

La *Gerbera* es una de las especies hortícolas de mayor demanda en el mercado interno cubano, pero su explotación está limitada ya que con los métodos tradicionales de multiplicación establecidos, no es posible cumplir con las demandas de "semillas". Este trabajo se realizó en la Biofábrica de Las Flores de Servicios Comunes, con la finalidad de establecer una metodología para la propagación comercial *in vitro* de la *Gerbera*. Para ello se estudiaron los medios de cultivo y manejo de los explantes en las diferentes fases de la micropropagación. Los resultados mostraron que con el empleo de Hipoclorito de Sodio al 0.5% durante 10 minutos, se logró una alta desinfección de los ápices. Combinando el 6-Bencilaminopurina (1.0 mg.l⁻¹) y el ácido giberélico (0.1 mg.l⁻¹) en el medio de cultivo fue posible incrementar el número de brotes por explantes durante el establecimiento. En la multiplicación los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de 6-BAP (2.0 mg.l⁻¹) con AIA (0.65 y 1.3 mg.l⁻¹), subcultivando los explantes mayores de 1.0 cm individualmente y en medio de cultivo semisólido. Una influencia significativa sobre el número de raíces y el crecimiento de los explantes se obtuvo adicionándole ácido indolacético al medio de cultivo de enraizamiento y utilizando para el subcultivo explantes mayores de 3.0 cm. La calidad de los explantes influyó significativamente en la aclimatización, demostrando que las plantas *in vitro* enraizadas deben tener más de 3.0 cm de altura.

Palabras clave: explantes, desinfección, ápices, medio de cultivo

ABSTRACT

Gerbera is one of the horticultural crops of great demand on the Cuban local market, but its exploitation is limited because with the traditional multiplication methods established, it is not possible to comply with the demands of the "seeds". This work was carried out at the biofactory of Las Flores de Servicios Comunes, with the objective of establishing a methodology for the *in vitro* commercial propagation of *Gerbera*. Culture media and explant management in the different micropropagation phases were studied. The results obtained showed that with sodium hypochlorite at 0.5% during 10 minutes, a high disinfection of the shoot tips was achieved. With the combination of 6-benzylaminopurine (1.0 mg.l⁻¹) and gibberellic acid (0.1 mg.l⁻¹) in the culture medium, it was possible to increase the number of shoots per explant during establishment. In the multiplication phase, the best results were obtained with a combination of 6-BAP (2.0 mg.l⁻¹) with AIA (0.65 and 1.3 mg.l⁻¹) subculturing the explants greater than 1.0 cm individually in semisolid culture medium. A significant influence on the number of roots and growth of the explants was achieved adding indolacetic acid to the rooting medium and using for the subculture, explants greater than 3.0 cm. The quality of the explants influenced significantly in the acclimatization phase, demonstrating that the plants rooted *in vitro* should be 3.0 cm in height.

Key words: explants, disinfection, shoot tip, culture medium

INTRODUCCIÓN

En Cuba la mayor extensión de tierra dedicada a la producción de flores es estatal, administrada por las Direcciones Provinciales de Servicios Comunes de cada provincia y por el Poder Popular. La importancia económica que alcanza la floricultura en el mundo es incalculable, pues la producción de flores se ha convertido en un negocio rentable dentro del sector agropecuario, dicha actividad cumple un papel muy importante en la solución de necesidades básicas de cualquier país, como son la generación de empleos y el aporte de divisa para la economía nacional.

El cultivo de la *Gerbera* en Cuba se realiza por dos métodos tradicionales de propagación: por semilla botánica y por división de plantas. La propagación por el primer método resulta menos utilizada, ya que el mismo exige una mayor inversión de recursos y trabajo, siendo más lento el inicio de la floración y mayores probabilidades de pérdidas de características deseadas, estas condiciones hacen que la propagación por semilla se limite generalmente a la realización de trabajos experimentales y a la producción e introducción de las variedades certificadas (Álvarez, 1999).

La propagación agámica por división garantiza al cultivador la homogeneidad de las plantas

producidas y un crecimiento, floración y calidad uniforme. Es el método más utilizado, además de ser el más fácil, el menos exigente y más rápido en comparación con el método de semilla.

Teniendo en cuenta las condiciones antes mencionadas, el presente trabajo tuvo como objetivo: establecer una metodología para la micropropagación de *Gerbera jamesonii* H. Bolus, a partir de plantas seleccionadas en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en la Biofábrica de las Flores perteneciente al Sectorial Provincial de Servicios Comunes de Villa Clara, en el período comprendido de enero del año 2000 a noviembre del 2001.

Material vegetal utilizado

Los explantes iniciales fueron tomados a partir de plantas élites de la variedad Paolo con seis meses de edad. Las mismas fueron sembradas en macetas usando como sustrato una mezcla de suelo (60%), estiércol vacuno con dos años de descomposición (30 %) y zeolita (10 %), el cual fue previamente desinfectado con vapor durante dos horas. Las plantas fueron mantenidas durante todo el ciclo de experimentación en condiciones controladas (invernadero), para atenuar el efecto negativo de los microorganismos contaminantes. Con el objetivo de aumentar la eficiencia en la fase de establecimiento fueron sometidas a aspersiones frecuentes (una semanal) con una mezcla de fungicidas (Zineb 75% PH, Oxidloruro de Cobre 50% PH, Maneb 80% PH, Mancoseb 80% PH) con una dosis de aspersión de 5 g.l⁻¹ durante cuatro semanas antes de la explantación.

Para los estudios de la fase de multiplicación y enraizamiento *in vitro* el material vegetal utilizado se encontraba en el tercer subcultivo.

Medio de cultivo

El medio de cultivo basal utilizado en todos los experimentos (semisólidos y líquidos), estuvo compuesto por las sales inorgánicas del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), el cual será referido a continuación como sales MS.

El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7 previo a la esterilización y como gelificante se empleó agar (Sigma Chemical, Co.) a razón de 4.5 g.l⁻¹. La esterilización se realizó en autoclaves a una temperatura de 121°C y una presión de 1.2 Kg f / cm² durante 15 minutos.

Procedimientos generales

En los experimentos relacionados con el establecimiento se utilizaron tubos de ensayo de 1.5

cm de diámetro por 20 cm con tapa de goma y retapa de papel de aluminio, a los que se le añadieron 10 ml de medio de cultivo (MS) en estado semisólido, al cual se le añadió 2% de sacarosa y 0.5 mg.l⁻¹ de tiamina. En la fase de multiplicación fueron utilizados frascos biotecnológicos de 250 ml de capacidad (Ramírez, 2000) dosificados con 30 ml de medio de cultivo semisólido y 20 ml en los casos que se emplearon medios de cultivos en estado físico líquido. En los medios de cultivo líquidos se utilizaron las sales MS al 70%.

Todos los experimentos fueron incubados en cámaras con luz solar y los explantes fueron sometidos a una densidad de flujo fotosintético de 48.0 – 62.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$, 11 horas luz por día y una temperatura de $27 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

La aclimatización de las vitroplantas se realizó en contenedores de polietileno de 70 alvéolos con una capacidad de 132 cm³ cada uno. El riego se realizó mediante la técnica de riego localizado con microaspersor aéreo con una frecuencia de tres riegos diarios en las dos primeras semanas y dos en las restantes, con una duración de dos a cinco minutos. Las plantas crecieron en condiciones de luminosidad reducida al 70 % mediante una malla plástica de color negro (Zarán).

Durante todo el proceso tanto *in vitro* como *ex vitro* la altura de la planta se determinó midiendo desde la base hasta la punta de la hoja más larga.

Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos en las diferentes variables y fases experimentales consistió en el análisis de varianza de clasificación simple y multifactorial según los casos de variables continuas, previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad. Para detectar las diferencias significativas entre las medias a un nivel del 5% se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan.

El número de réplicas utilizadas en cada experimento *in vitro* fue de 10 frascos y para el área de aclimatización fue de 20 plantas.

Fase de establecimiento

Para el pretratamiento del material vegetal antes de iniciar el establecimiento se cortaron todas las hojas de las plantas cultivadas y se tomaron los ápices, dejando los mismos con aproximadamente 3.0 cm de longitud. Posteriormente se lavaron con abundante agua corriente y se cepillaron ligeramente para eliminar los restos de sustrato, finalmente se mantuvieron durante cinco minutos en una solución de detergente al 1%, y se lavaron nuevamente con abundante agua.

Desinfección de los explantes

Para determinar el desinfectante a utilizar, la concentración del mismo, el tiempo de exposición del material inicial y su efecto para

la desinfección superficial, se probaron dos concentraciones de NaOCl (0.5% y 1%) y alcohol (70%) en intervalos de tiempo de exposición del material que se describe ha continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia del Hipoclorito de Sodio y el alcohol en la desinfección de explantes de *Gerbera*.

Tratamientos	Concentraciones	Tiempo de exposición (minutos)
1	NaClO 0.5 %	10
2	NaClO 0.5 %	15
3	NaClO 1.0 %	10
4	NaClO 1.0 %	15
5	Alcohol 70 %	3
6	Alcohol 70 %	5
7	Alcohol 70 % + NaClO 0.5%	3+5
8	Alcohol 70 % + NaClO 1.0%	3+5
9	Alcohol 70 % + NaClO 0.5%	5+5
10	Alcohol 70 % + NaClO 1.0%	5+5
11	Alcohol 70 % + NaClO 0.5%	3+10
12	Alcohol 70 % + NaClO 1.0%	3+10
13	Alcohol 70 % + NaClO 0.5%	5+10
14	Alcohol 70 % + NaClO 1.0%	5+10

Las evaluaciones se realizaron a los siete días de realizada la implantación. Las variables medidas fueron: altura de la planta (cm), número de hojas por planta, número de brotes, porcentaje de explantes vivos y porcentaje de explantes contaminados.

El procesamiento de los datos se realizó a través de un ANOVA multifactorial y comparación de medias a través de Kruskal – Wallis.

Efecto de los reguladores de crecimiento en la fase de establecimiento

Se evaluó el efecto de dos reguladores del crecimiento en el establecimiento y crecimiento de los ápices partiendo de la composición de medios de cultivos recomendados para el establecimiento, en cultivo de *Gerbera* (Barbosa *et al.*, 1993). Se utilizó un medio de cultivo en estado semisólido basado en las sales MS, con 20 g de sacarosa y 0.5 mg.l⁻¹ de tiamina suplementado con 6 BAP (6 Bencilaminopurina) y AG₃ (Acido giberélico) en las combinaciones que se describen a continuación:

Tratamientos:

- T- 1 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.01 mg.l⁻¹ AG₃)
- T- 2 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.1 mg.l⁻¹ AG₃)
- T- 3 (1.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.01 mg.l⁻¹ AG₃)
- T- 4 (1.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.1 mg.l⁻¹ AG₃)

- T- 5 (2.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.01 mg.l⁻¹ AG₃)
- T- 6 (2.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.1 mg.l⁻¹ AG₃)

Las evaluaciones se realizaron a los 21 días del cultivo *in vitro* y las variables evaluadas fueron: altura de la planta (cm), número de hojas, número de brotes y coeficiente de multiplicación.

El procesamiento de los datos se realizó a través de un ANOVA bifactorial y la comparación de medias mediante el Test de Duncan al 5%.

Fase de multiplicación

Efecto de los medios de cultivo suplementados con diferentes reguladores del crecimiento

Se evaluó el comportamiento de la multiplicación de los explantes en presencia de diferentes reguladores del crecimiento durante tres subcultivos, teniendo en cuenta los antecedentes de otros trabajos similares realizados por otros autores con especies de este género (Pierik *et al.*, 1973; 1982). Se estudiaron tres concentraciones de 6 BAP (6 Bencilaminopurina) combinadas con tres de Kinetina y dos de Ácido Indolacético (AIA).

Las evaluaciones se realizaron a los 21 días y las variables evaluadas fueron: altura de la planta (cm), número de hojas, número de brotes y coeficiente de multiplicación.

Tratamientos:

T- 1 (0.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 2.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 2 (0.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 2.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 3 (0.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 4.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 4 (0.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 4.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 5 (0.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 6.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 6 (0.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 6.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 7 (2.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 0.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 8 (2.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 0.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 9 (4.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 0.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 10 (4.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 0.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 11 (6.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 0.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l ⁻¹ AIA)
T- 12 (6.0 mg.l ⁻¹)	6 BAP, 0.0 mg.l ⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l ⁻¹ AIA)

Influencia del estado físico del medio de cultivo en la fase de multiplicación

Se evaluó la influencia de dos estados físicos del medio de cultivo, (semisólido y líquido), los cuales constituyeron en el comportamiento de los explantes de la fase de multiplicación *in vitro* su efecto sobre el coeficiente de multiplicación y crecimiento de las vitroplantas.

El medio de cultivo utilizado fue el (MS) modificado por Zárraga y Granada (1990), suplementado con 3% de sacarosa, 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina y 3.0 mg.l⁻¹ de 6 BAP.

Tratamientos:

- Medio de cultivo en estado semisólido
- Medio de cultivo en estado líquido

Las variables evaluadas fueron: altura de la planta (cm), números de hojas, números de brotes y coeficiente de multiplicación.

Influencia del manejo de los explantes

Con el objetivo de incrementar los índices de multiplicación y de crecimiento de los explantes en la fase de multiplicación se tomaron vitroplantas de tamaño uniforme que habían sido subcultivadas tres veces. Las variantes de manejo se evaluaron a los 21 días a 50 vitroplantas.

Variantes de manejo:

- Explantes mayores de 1.0 cm individualizados.
- Explantes mayores de 1.0 cm individualizados y con corte del 50 % del follaje.
- Explantes mayores de 1.0 cm individualizados y con corte del 75 % del follaje.

Fase de enraizamiento**Efectos de los reguladores de crecimiento y la sacarosa en la fase de enraizamiento *in vitro***

Se realizó con el objetivo de inducir la formación de raíces y el crecimiento de las plantas *in vitro* para su posterior transferencia hacia la fase de aclimatización. Se estudiaron dos auxinas (AIA,AIB) con tres concentraciones cada una combinadas con dos concentraciones de sacarosa (3 – 4%) sobre un medio de cultivo basal constituido por las sales MS + 1.0 mg.l⁻¹ + 100 mg de Myonositol. Las evaluaciones se realizaron a los 28 días.

Las variables evaluadas fueron: altura de la planta (cm), número de raíces, número de hojas y supervivencia (%).

Tratamientos:

T -1 (1.3 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -2 (1.3 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)
T -3 (2.6 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -4 (2.6 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)
T -5 (3.9 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -6 (3.9 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)
T -7 (0mg.l ⁻¹ AIA, 1.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -8 (0mg.l ⁻¹ AIA, 1.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)
T -9 (0mg.l ⁻¹ AIA, 2.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -10 (0mg.l ⁻¹ AIA, 2.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)
T -11 (0mg.l ⁻¹ AIA, 3.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -12 (0mg.l ⁻¹ AIA, 3.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)

Influencia del manejo de los explantes y del estado físico del medio de cultivo

Con el objetivo de evaluar el manejo de los explantes combinados con el estado físico del medio de cultivo (Tabla 2), se transfirieron vitroplantas procedentes del medio de cultivo de multiplicación con tres subcultivos a medio de cultivo de enraizamiento, compuesto por las sales MS al 100% y 70% para el medio de cultivo en estado semisólido y líquido respectivamente suplementado con 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de Mionositol, 1.3 mg.l⁻¹ de AIA y 4% de sacarosa.

Tabla 2. Tratamiento para evaluar el comportamiento del manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo en la fase de enraizamiento de la *Gerbera*.

Tratamiento	Tipo de explantes	Estado físico del medio de cultivo
1	Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados	Semisólido
2	Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados	Líquido
3	Explantes mayores de 3.0 cm individualizados	Semisólido
4	Explantes mayores de 3.0 cm individualizados	Líquido
5	Explantes sin individualizar	Semisólido
6	Explantes sin individualizar	Líquido

Las evaluaciones se realizaron a los 21 días y las variables evaluadas fueron: altura de la planta (cm), número de raíces, número de hojas y supervivencia (%).

Fase de aclimatación

Comportamiento de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatación

Se evaluó la influencia de la altura de las plantas en su comportamiento en la fase de aclimatación.

Tratamientos:

- Plantas menores de 3 cm.
- Plantas de 3 – 5 cm.
- plantas mayores de 5 cm.

Se realizaron evaluaciones a los 30, 45, 60 días teniendo en cuenta los siguientes variables: altura de la planta cm, número de hojas, salida del cepellón y la supervivencia de las vitroplantas a los 15 días.

Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos en las diferentes variables y fases experimentales consistió en el análisis de varianza de clasificación simple y multifactorial según los casos de variables continuas, previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad. Para detectar las diferencias significativas entre las medias a un nivel del 5% se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 8.1 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de establecimiento

Desinfección de los explantes en la fase de establecimiento

Se observó una ligera tendencia a la disminución de la supervivencia en la medida que aumentó la concentración de desinfectantes y el tiempo de exposición de los explantes. Los mayores porcentajes de explantes contaminados se obtuvieron con el uso de alcohol al 70% (tratamiento 5 y 6), lo que demostró

que este desinfectante solo no es efectivo para eliminar la contaminación superficial de los ápices de *Gerbera*. El tratamiento 1 (NaOCl 0.5%) mostró el valor máximo de supervivencia con diferencias significativas con los restantes y resultó ser de los mejores en cuanto al bajo porcentaje de explantes contaminados, por lo que se definió este tratamiento como el más efectivo en la desinfección (Tabla 3).

Similares resultados obtuvo Villalobos, (1982) en el cultivo del Clavel con el uso de NaOCl con concentraciones de 0.5% y con tiempos de 10 a 15 minutos. No siendo así para los resultados obtenidos en la desinfección de ápices de Lirios donde obtuvo los mejores resultados con concentraciones del 3% de NaOCl y tiempos de 15 a 20 minutos.

En lo que al porcentaje de NaOCl se refiere, con 0.5% se lograron resultados significativos en relación con el 1.0% y estos porcentajes de desinfectante fueron inferiores a los empleados en otros cultivos como *Xanthosoma*, en el cual se utilizan 2 y 2.5%, pero coincide con el usado en desinfección de explantes de *Eucalipto* (Delgado, 2000).

Efecto de los reguladores de crecimiento en la fase de establecimiento

Los resultados mostraron una tendencia al incremento de los valores de la altura de la planta según disminuyó la concentración de 6 BAP en el medio de cultivo, aunque no en todos los casos las diferencias estadísticas entre los tratamientos se comportaron similares. Los máximos valores en la altura de las plantas se obtuvieron con los tratamientos en los que se utilizó solamente el AG₃ como regulador del crecimiento, con diferencias significativas con los restantes. En cuanto a las variables número de brotes y coeficiente de multiplicación la tendencia se manifestó en un aumento de los valores para las dos variables, mostrando los tratamientos donde se utilizó además el 6 BAP, resultados significativamente superiores a aquellos en los que solo se usó el AG₃. El tratamiento 4 (0.1mg. l⁻¹ AG₃+1.0 mg.l⁻¹ 6BAP), mostró de forma integral los mejores resultados, ya que fue el de que mayor coeficiente de multiplicación obtuvo y mostró el máximo valor en el número de brotes aunque sin diferencias con el cinco (Tabla 4).

Tabla 3. Influencia del Hipoclorito de Sodio y el alcohol en la desinfección de explantes de *Gerbera*.

Tratamiento	Concentraciones	% de explantes	
		vivos	contaminados
1	NaOCl 0.5 %	67.6(a)	15.8(ab)
2	NaOCl 0.5 %	49.8 (cd)	13.5(ab)
3	NaOCl 1.0 %	51.3c	14.6(ab)
4	NaOCl 1.0 %	40.6(e)	12.9(ab)
5	Alcohol 70 %	41.4(e)	50.4(d)
6	Alcohol 70 %	39.7(e)	41.6c
7	Alcohol 70 % + NaOCl 0.5%	60.3(b)	18.5(b)
8	Alcohol 70 % + NaOCl 1.0%	44.2(cd)	16.1(b)
9	Alcohol 70 % + NaOCl 0.5%	39.6(e)	16.7(b)
10	Alcohol 70 % + NaOCl 1.0%	35.1(e)	14.6(ab)
11	Alcohol 70 % +NaOCl 0.5%	43.8(de)	14.4(ab)
12	Alcohol 70 % + NaOCl 1.0%	38.5(e)	8.7(a)
13	Alcohol 70 % + NaOCl 0.5%	39.7(e)	13.8(ab)
14	Alcohol 70 % + NaOCl 1.0%	32.4(ef)	7.3(a)
ES		2.4	6.8

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tabla 4. Evaluación del efecto del 6 BAP y el AG3 en establecimiento de ápices de *Gerbera*.

Tratamientos	Altura de la planta	Nº de brotes	Coefficiente de multiplicación
1	3.3 (a)	2.2 (c)	2.2 (b)
2	3.8 (a)	2.2 (c)	2.0 (b)
3	2.4 (b)	2.6 (b)	3.0 (a)
4	2.6 (b)	4.2 (a)	3.6 (a)
5	2.1 (b)	3.8(ab)	3.2 (a)
6	2.4 (b)	3.6 (b)	3.2 (a)
ES	0.2	0.15	0.2

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tratamientos:

T- 1 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.01 mg.l⁻¹ AG3)

T- 2 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.1 mg.l⁻¹ AG3)

T- 3 (1.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.01 mg.l⁻¹ AG3)

T- 4 (1.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.1 mg.l⁻¹ AG3)

T- 5 (2.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.01 mg.l⁻¹ AG3)

T- 6 (2.0 mg.l⁻¹ 6 BAP + 0.1 mg.l⁻¹ AG3)

El comportamiento del crecimiento mostrado por los explantes en esta fase se fundamenta en lo planteado por Vázquez y Torres (1995), quienes sugirieron que para que ocurra la brotación y crecimiento de los tejidos es necesario un adecuado balance endógeno de reguladores de crecimiento. Este balance se alcanza de forma natural en la planta, sin embargo cuando se aislan tejidos para multiplicarlos en condiciones artificiales, como ocurre en el cultivo *in vitro* la adición exógena de reguladores del crecimiento es imprescindible. En este caso se observó que la función principal del AG₃ fue elongar los brotes

y el 6 BAP incrementó el número de brotes por explantes debido a su efecto sobre la división celular. Los tratamientos que mostraron un incremento en el número de brotes y el coeficiente de multiplicación, tuvieron menor altura de la planta.

Resultados similares fueron obtenidos por Divo de Sesar y Vilella (1994) en el cultivo de la *Gerbera* empleando bajas concentraciones de BAP (0.25 a 2 mg.l⁻¹) y 0.01 mg.l⁻¹ de AG₃, pero usando como material de implantación capítulos en inicio de floración.

Efecto de los medios de cultivo suplementados con diferentes reguladores del crecimiento en la fase de multiplicación

Los resultados de la tabla 5, muestran que de forma general los tratamientos en los que se usó el 6 BAP como citoquinina para estimular la formación de los brotes, tuvieron un comportamiento ligeramente superior a los tratamientos con

kinetina, lo cual evidenció una mayor respuesta de los tejidos de *Gerbera* a la influencia del 6 BAP en esta fase de micropropagación. Los máximos valores para todas las variables evaluadas se obtuvieron con los tratamientos en los cuales se utilizaron 2.0 mg.l⁻¹ de 6 BAP combinado con 0.65 y 1.3 mg.l⁻¹ de AIA, los cuales superaron significativamente a los restantes, excepto al tratamiento nueve.

Tabla 5. Efecto de los reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación de *Gerbera*.

Tratamientos	Altura de la planta	Nº de hojas	Nº de Brotes	Coefficiente Multiplicación
1	3.2 (d)	3.6(cd)	7.9c	7.3c
2	3.3(d)	3.6(cd)	8.3c	7.9c
3	3.0(e)	3.4(cd)	7.0(d)	6.4(d)
4	3.2 (d)	3.5(cd)	7.4(d)	6.7(d)
5	2.7(e)	3.2(d)	6.2c	5.6c
6	2.8(e)	3.3(d)	6.6c	6.2(b)
7	4.8(a)	4.2(ab)	11.0(a)	9.8(a)
8	4.5(ab)	4.3(a)	10.9(a)	10.2(a)
9	3.8(bc)	3.6(cd)	9.1(bc)	8.4c
10	4.0(b)	3.8(bc)	9.4(b)	9.0(b)
11	3.6(cd)	3.3(d)	8.6c	8.1c
12	3.8(c)	3.5(c)	9.2(b)	8.8(bc)
ES	0.21	0.15	0.18	1.1

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tratamientos:

- T- 1 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 2.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l⁻¹AIA)
- T- 2 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 2.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l⁻¹AIA)
- T- 3 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 4.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l⁻¹AIA)
- T- 4 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 4.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l⁻¹AIA)
- T- 5 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 6.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l⁻¹AIA)
- T- 6 (0.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 6.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l⁻¹AIA)
- T- 7 (2.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 0.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l⁻¹AIA)
- T- 8 (2.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 0.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l⁻¹AIA)
- T- 9 (4.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 0.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l⁻¹AIA)
- T- 10 (4.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 0.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l⁻¹AIA)
- T- 11 (6.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 0.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 0.65 mg.l⁻¹AIA)
- T- 12 (6.0 mg.l⁻¹ 6 BAP , 0.0 mg.l⁻¹ Kinetina , 1.3 mg.l⁻¹AIA)

Resultados similares encontraron Divo de Sesar *et al.* (1996) y Olivera *et al.* (2000) en el cultivo de la *Gerbera* cuando emplearon combinaciones de 1.5-2.5 mg.l⁻¹ de 6 BAP y 0.50 - 1.5 mg.l⁻¹ de AG3.

Influencia del estado físico del medio de cultivo en la fase de multiplicación

Como se aprecia en la tabla 6 las plantas *in vitro* que fueron subcultivadas en medios de cultivo semisólidos mostraron valores significativamente

superiores a las subcultivadas en medios de cultivo líquidos, para todas las variables evaluadas. Estas diferencias demuestran que esta especie es sensible a la multiplicación continua en medios de cultivo líquidos.

El efecto negativo de los medios de cultivos líquidos en esta fase en condiciones estáticas ha sido observado por diferentes autores en otras especies como plátanos y bananos (Orellana, 1995), *Solanum tuberosum* L. (Agramonte, 1999).

Tabla 6. Efecto del estado físico del medio para la multiplicación en *Gerbera*.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Nº de hojas.	Nº de brotes	Coefficiente de multiplicación
Medio de cultivo líquido	3.8	3.5	6.9	6.2
Medio de cultivo semisólido	4.6*	4.1*	10.4*	9.8*
ES	0.12	0.15	0.8	0.5

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Influencia del manejo de los explantes

El tipo de manejo influyó sobre el comportamiento de las plantas *in vitro* en la fase de multiplicación. Como se observa en la tabla 7, el tratamiento en el cual se individualizaron los explantes mayores de 1.0 cm mostró los máximos valores en relación con

todas las variables evaluadas, superando de forma significativa el resto de los tratamientos. Estos resultados demuestran que la *Gerbera* es una especie susceptible a los cortes en el manejo *in vitro*, a diferencia de otros en los cuales los cortes longitudinales y transversales estimulan la formación de nuevos brotes (Martínez, 1995).

Tabla 7. Comportamiento del manejo de los explantes de *Gerbera* en la fase de multiplicación.

Tratamientos	Altura de la planta	Nº de hojas	Nº de Brotes	Coefficiente de multiplicación
1	4.9(a)	4.6(a)	11.4(a)	10.8(a)
2	4.2(b)	4.0(b)	10.7(b)	10.1(b)
3	4.0(bc)	3.9(b)	10.3(b)	9.5(c)
ES	0.2	0.1	0.15	0.06

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Variantes de manejo:

1 - Explantes mayores de 1.0 cm individualizados.

2 - Explantes mayores de 1.0 cm individualizados y con corte del 50 % del follaje.

3 - Explantes mayores de 1.0 cm individualizados y con corte del 75 % del follaje.

Fase de enraizamiento

Efecto de los reguladores de crecimiento y la sacarosa en la fase de enraizamiento *in vitro*

La figura 1, muestra que en cuanto al número de raíces hubo un comportamiento significativamente superior a los tratamientos en los que se usó AIA, en relación con el uso de AIB, destacándose el tratamiento 2, aunque no tuvo diferencias con los tratamientos 1, 3 y 4.

El empleo de la auxina (AIA) también puede favorecer al desarrollo de las raíces, así como el crecimiento de las plantas Villalobo (1982), lograron en el cultivo del Crisantemo un buen desarrollo de las plantas y crecimiento de las raíces con concentraciones similares de auxinas (AIA).

Estos resultados coinciden con Vuylsteke (1989), quién demostró la acción de las auxinas sobre el alargamiento celular lo cual provoca el crecimiento de las raíces de plátano, recomendándose su empleo en la mayor de los medios de enraizamiento referidos en la literatura y es

precisamente el AIA, una de las auxinas empleadas en esta fase (Quintana, 1995).

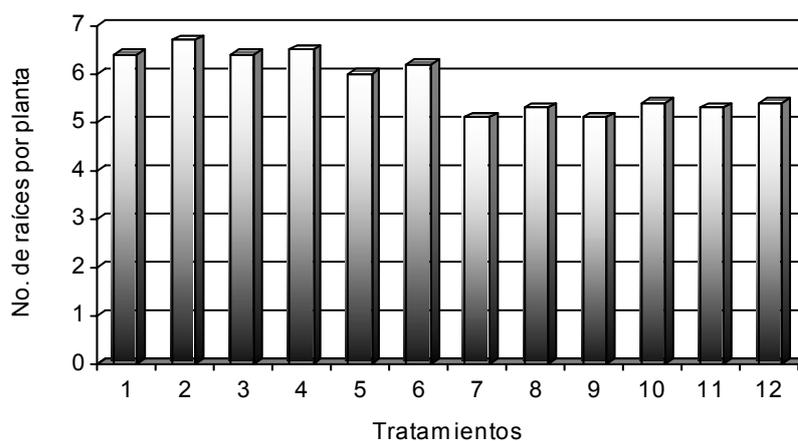
Coincidiendo con estos resultados Olivera *et al.* (2000) y Martínez (1995), concluyeron que el estimulante de crecimiento es influenciado por el AIA, el que es empleado en concentraciones de 1.3 mg.l⁻¹ para el enraizamiento *in vitro* de plátano y banano.

Influencia del manejo de los explantes y del estado físico del medio de cultivo

El estado físico del medio de cultivo y el manejo de los explantes influyeron en el crecimiento de las plantas en la fase de enraizamiento y en la supervivencia en la aclimatización. Los resultados más bajos en el número de raíces y el porcentaje de supervivencia se observó en los tratamientos en los que se utilizaron explantes menores de 3.0 cm y explantes sin individualizar, tanto en medios de cultivos líquidos como sólidos. Esto indicó que la calidad del explante fue determinante en esta fase, por lo tanto se debe desarrollar una estrategia de manejo durante los subcultivos precedentes que garantice mayor porcentaje de explantes mayores

de 3.0 cm. La influencia del estado físico de esta fase fue menor que la calidad del explante, lo cual se evidencia al comparar los tratamientos tres y

cuatro, los que superaron significativamente a los restantes, sin embargo no mostraron diferencias entre ellos (Tabla 8).



Letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Figura 1. Influencia de los reguladores de crecimiento y la sacarosa en la inducción de raíces en el enraizamiento de *Gerbera*.

Tratamientos:

T -1 (1.3 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)	T -7 (0mg.l ⁻¹ AIA, 1.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -2 (1.3 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)	T -8 (0mg.l ⁻¹ AIA, 1.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)
T -3 (2.6 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)	T -9 (0mg.l ⁻¹ AIA, 2.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -4 (2.6 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)	T -10 (0mg.l ⁻¹ AIA, 2.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)
T -5 (3.9 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)	T -11 (0mg.l ⁻¹ AIA, 3.0 mg.l ⁻¹ AIB, 3 % sacarosa)
T -6 (3.9 mg.l ⁻¹ AIA, 0.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)	T -12 (0mg.l ⁻¹ AIA, 3.0 mg.l ⁻¹ AIB, 4 % sacarosa)

Tabla 8. Comportamiento del manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo en la fase de enraizamiento de *Gerbera*.

Tratamientos	Altura de la planta	Nº de hojas	Nº de raíces	Supervivencia (%)
1	4.2c	3.9c	5.5b	89.3b
2	4.1c	3.8c	5.2b	87.6b
3	4.9a	4.8a	6.7a	98.8a
4	5.1a	4.6a	6.4a	97.5a
5	4.6b	4.2b	4.8c	85.0b
6	4.1c	4.0bc	4.5c	83.5b
ES	0.06	0.08	0.12	2.3

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según la prueba de rangos múltiples de Duncan. (Ver tratamientos en la tabla 2).

Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Lanford y Wainwright (1997) en el cultivo de la rosa, quienes afirmaron que un buen manejo de los explantes en la última etapa de multiplicación y en la etapa de enraizamiento produjo un efecto favorable en la calidad de las plantas que salen enraizadas y durante el período de aclimatización. De igual manera Grout y Millan (1985) y Wainwright y Scrace (1995) en *Gerbera* señalaron que la diferenciación del tamaño de los explantes al ser pasado a medios de cultivos de enraizamiento permitió realizar una mejor planificación de la producción ya que se obtuvieron vitroplantas con una mayor homogeneidad

en cuanto al tamaño y número de raíces mejorando la calidad de las plantas establecidas en invernaderos.

Fase de aclimatización

Comportamiento de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre los grupos de vitroplantas marcadas para las variables relacionadas, con valores superiores en el tratamiento de vitroplantas mayores

de cinco centímetros el comportamiento fue proporcionalmente lineal en relación con la altura de

los grupos en las variables de supervivencia, altura de la planta, número de hojas y salida del cepellón (Tabla 9).

Tabla 9 Influencia de la altura de las plantas en el comportamiento en la fase de aclimatización de plantas *in vitro* de *Gerbera*.

Tratam (altura)	(% Superv	Altura de la planta/ (días ciclo)			Nº de Hojas (días del ciclo)			Salida del cepellón (días del ciclo)		
		30	45	60	30	45	60	30	45	60
<3 cm	99.2a	11.4b	13.6a	14.2a	6.2a	7.4a	7.9a	3.0a	3.0a	3.0
3-5 cm	95.4b	8.7b	11.9b	13.8ab	4.9b	6.3b	7.6a	2.89b	3.0a	3.0
>5 cm	76.8c	5.3v	8.2	11.6b	4.0b	5.8c	6.9b	2.11c	2.75b	3.0
ES	3.8	2.5	2.1	1.9	2.0	1.4	1.7	0.10	0.20	0.02

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Torres (1999), en el cultivo de la *Gerbera* señaló que el tamaño de la vitroplanta al ser transferida al área del invernadero fue directamente proporcional con el porcentaje de supervivencia de las vitroplantas y con el tiempo de estancia en el invernadero.

CONCLUSIONES

El estudio de las etapas de micropropagación permitió establecer la tecnología para la multiplicación *in vitro* de la *Gerbera* la cual comprende:

La desinfección de los ápices con Hipoclorito de Sodio 0.5% durante 10 minutos en un medio de cultivo con 1 mg.l⁻¹ 6-BAP y 0.1 mg.l⁻¹ AG₃.

En fase de multiplicación se obtuvieron los mejores resultados al individualizar los explantes con un medio de cultivo con 2 mg.l⁻¹ 6-BAP, 1.3 mg.l⁻¹ AIA y 3% de sacarosa.

Se logró un mejor comportamiento del crecimiento de las vitroplantas al separar los explantes en la fase de enraizamiento con 4% de sacarosa y 1.3 mg.l⁻¹ AIA en medio semisólido.

Las diferencias de acuerdo con la altura de las vitroplantas en la fase de enraizamiento se pusieron de manifiesto en la fase de aclimatización, con los mejores resultados para las plantas mayores de cinco centímetros.

REFERENCIAS

Agramonte, D (1999) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba

Agramonte, D, Pérez J, Pérez M y Pérez A (1993) Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCl) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola 2pp 88-89

Divo de Sesar, M, Ambroggio A y Vilella F (1996) Micropropagación de *Gerbera jamesonii* Patrones de desarrollo asociados a la

concentración exógena de 6- Bencilaminopurina. Cátedra de producción vegetal. Buenos Aires

Grout, B y Millan S (1985) Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Ann. Bot. 55pp 129-131

Langford, P J y Wainwright (1997) Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. Ann. Bot. 60pp 633-640

Martínez, SJ (1995) Perfeccionamiento de la tecnología para la micropropagación *in vitro* de Plátanos y Bananos (*Musa* spp). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. Plant Physiology 15pp 473-479

Olivera, Z, Gutiérrez A, Gutiérrez J y Rodríguez M (2000) Cultivo *in vitro* de *Gerbera* (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatización en invernaderos. BIOAGRO: 12(3): 75-80

Orellana, P P (1998 a) Introducción a la Propagación Masiva (capítulo 7). En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. pp125-132

Orellana, P P (1995) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en ciencias Agrícolas

Quintana, MR (1995) Cultivo *in vitro* en *Vigna luteola* SC-123. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas

Rodríguez, A (2000) Comunicación personal. Santa Clara.

Torres, J G (1999) Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48pp 213-217

Villalobos, A V (1982) Tissue cultura aplyed to ornamental species in: Micropropagación of selected root crop, ornamental species. Rome P. 155-164

Vuyksteke, DT (1989) Shoop-tip cultura for the propagation on growth and anatomy of adventitious shorts of *Picea abies* L. Kars. Plant Cell Tiss Org. Cult. 3: 257-264

Wainwright, H y Scrace J (1995) Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vivo* establishment. Sci. Hort. 38pp 261-267