

Multiplicación *in vitro* de *Zantedeschia* spp. variedad Treasure en Sistemas de Inmersión Temporal

Javier Sánchez, Marcos Daquinta*, Iris Capote. *Autor para correspondencia.

Centro de Bioplantas, UNICA, Carretera a Morón, km 9 Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: jacksaenz100@yahoo.com, mdaquinta@bioplantass.cu

RESUMEN

Las callas (*Zantedeschia* spp.) son plantas de la familia *Araceae* de gran interés como plantas ornamentales en maceteros y como flores de corte. Aunque se han propagado por cultivo *in vitro*, existen pocos trabajos científicos sobre su micropropagación en Sistemas de Inmersión Temporal. Con el objetivo de multiplicar *in vitro* *Zantedeschia* spp. en Sistemas de Inmersión Temporal se realizó este trabajo. Para ello, se determinó el efecto de diferentes frecuencias de inmersión y concentraciones de Paclobutrazol (PBZ) en la proliferación y calidad de los brotes. La integración de estos experimentos conllevaron a obtener un mayor coeficiente de multiplicación (9.7 brotes por explante) con una frecuencia de inmersión cada cuatro horas y el suplemento de 0.3 mg.l⁻¹ de PBZ al medio de cultivo.

Palabras clave: callas, frecuencia de inmersión, ornamentales, retardantes del crecimiento

ABSTRACT

Callas (*Zantedeschia* spp.) are plants from *Araceae* family of a great interest as ornamental plants in pots and as cut flowers. Although they have been propagated by *in vitro* culture, there are few scientific studies on the micropropagation in temporary immersion systems. This work was carried out in order to multiply *in vitro* *Zantedeschia* spp. in Temporary Immersion Systems. Effect of different immersion frequencies and concentrations of Paclobutrazol (PBZ) on the proliferation and quality of shoots was determined. The integration of these experiments lead to obtain a higher coefficient of multiplication (9.7 shoots per explant) with a frequency of immersion every four hours and the supplement of 0.3 mg.l⁻¹ of PBZ in the culture medium.

Keywords: callas, growth retardants, immersion frequency, ornamentals

INTRODUCCIÓN

Las Aráceas son plantas perennes, terrestres, tuberosas o rizomatosas; esta familia es la más diversa de las zonas tropicales del nuevo mundo, aunque también están distribuidas por el viejo mundo, en zonas tanto tropicales como cálidas, comprenden, más de 107 géneros y unas 3 000 especies. A esta familia pertenecen plantas ornamentales ampliamente conocidas como *Anthurium* y *Philodendron* (De la Luz y Ortega, 1985).

La propagación del género *Zantedeschia* (familia Arácea) se realiza a través de semillas (en programas de mejoramiento genético), por separación de plantas (permite la formación del tubérculo y separar los tallos una vez que tienen raíz) y por división del tubérculo (practicada para incrementar el número y el tamaño de la floración). Sin embargo, los cultivos con

división de tubérculos, están expuestos a pudrición blanda ocasionada por *Erwinia* sp. (Chen *et al.*, 2000). Este género es muy susceptible a dicha bacteria que puede causar pérdidas de hasta el 100% en la plantación (Etcheverría, 2002).

Especies del género *Zantedeschia* se han propagado por cultivo de tejidos. Por ejemplo, se han empleado estas técnicas como una vía alternativa de plantación para la producción de tubérculos de *Zantedeschia aethiopica* (Clemens y Welsh, 1993; Fang *et al.*, 1999). Además, se ha informado de la micropropagación convencional de *Zantedeschia albomaculata*, con la utilización de reguladores de crecimiento como 6-benciladenina y tiazuron (Chang *et al.*, 2003).

La propagación *in vitro* de plantas sobre medio de cultivo semisólido es una labor intensiva y

tiene altos costos de producción. Sin embargo, los Sistemas de Inmersión Temporal se usan exitosamente para la propagación de varias especies de plantas y se consideran como una labor menos intensiva y por lo tanto menos costosa (Etienne y Berthouly, 2002). Existen pocos trabajos científicos sobre micropropagación de *Zantedeschia* en Sistemas de Inmersión Temporal. En uno de ellos, Ruffoni *et al.* (2002), refirieron tasas de multiplicación muy bajas. Estas no variaron, posteriormente, cuando se compararon el sistema convencional y los Sistemas de Inmersión Temporal (Ruffoni y Savona, 2005). Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue multiplicar *in vitro* *Zantedeschia* spp. en Sistemas de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se establecieron plantas *in vitro* de *Zantedeschia* spp. variedad Treasure, a partir de tubérculos aviverados. La desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos y varios enjuague con agua destilada estéril.

Con el objetivo de incrementar el material vegetal para el desarrollo ulterior de los experimentos se realizaron previamente cuatro subcultivos en medio de cultivo semisólido. Estos consistieron en separar brotes individuales de los agregados y colocarlos en medio de cultivo fresco, a razón de cinco brotes por frasco. Previo a los subcultivos, las hojas del brote se eliminaron y el explante se cortó a una altura de 1.5 cm desde la base. De presentarse raíces, brotes hiperhídricos o masa de callos en la base de los brotes, estos se eliminaron previamente. Este mismo procedimiento se siguió para el manejo del explante que se inoculó en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT). Por tanto, un explante se definió como un brote aislado menor de 1.5 cm de altura desprovisto de hojas, raíces y callo en la base.

Efecto de la frecuencia de inmersión

En este experimento se determinó el efecto de diferentes frecuencias de inmersión en la proliferación de los brotes en SIT. Se empleó

un medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado con 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, 1 mg.l⁻¹ de tiamina, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y 4 mg.l⁻¹ de BAP. Se utilizaron SIT de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo y cinco explantes por sistema.

Los tratamientos consistieron en tres frecuencias de inmersión con intervalos de tres, cuatro y seis horas, con un tiempo de inmersión de cuatro minutos. Se utilizó un diseño monofactorial completamente aleatorio con tres repeticiones por tratamiento.

A los 28 días de cultivo se determinó el coeficiente de multiplicación según la fórmula número de explantes finales entre el número de explantes iniciales y se describió la calidad de los brotes a través de la altura (cm) y el número de hojas por brote. Para esto se analizaron todos los brotes obtenidos por SIT. Se seleccionó la frecuencia de inmersión que proporcionó brotes con los mayores valores de las variables utilizadas.

Efecto del Paclobutrazol (PBZ)

En este experimento se adicionaron diferentes concentraciones de Paclobutrazol (PBZ) (0.0, 0.3, 0.6 mg.l⁻¹) al medio de cultivo basal MS modificado, descrito anteriormente, con el objetivo de determinar el posible efecto sinérgico citoquininas-retardante del crecimiento en la proliferación de los brotes en SIT. Se empleó la frecuencia de inmersión seleccionada en el ensayo anterior, se inocularon cinco explantes por SIT y el volumen de medio de cultivo fue de 100 ml por frasco. Se utilizó un diseño monofactorial completamente aleatorio con tres repeticiones por tratamiento.

A los 28 días de cultivo se determinó el coeficiente de multiplicación y se describió la calidad de los brotes según se indicó anteriormente. Para la determinación de los indicadores de calidad se analizaron todos los brotes obtenidos por SIT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la frecuencia de inmersión

Entre los factores más importantes a tratar en la técnica de cultivo en inmersión temporal, está

la frecuencia de inmersión. Al evaluar el efecto de esta variable durante la proliferación de *Zantedeschia* spp. en SIT se encontró que la frecuencia de inmersión cada cuatro horas aumentó significativamente el coeficiente de multiplicación después de 28 días de cultivo. Este alcanzó valores de 12.53 (Figura 1). Los indicadores de calidad de los brotes como son el número de hojas por brote y la altura no mostraron diferencia significativas entre sí en los brotes cultivados en las diferentes frecuencias de inmersión.

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 estos se ponen en contacto con el medio de cultivo líquido y de esa forma se toman los nutrientes y reguladores del crecimiento, se logra la aireación e intercambio gaseoso del vaso de cultivo y se regula el nivel de hiperhidricidad de los brotes (Rademacher, 2000). La eficacia 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 líquido (Etienne y Berthouly, 2002) lo cual favorece la tasa de multiplicación.

Bajo las condiciones que se experimentaron se logró aumentar el coeficiente de multiplicación de brotes en SIT con una frecuencia de inmersión cada 4 horas.

Resultados similares han sido obtenidos en bromelias y otras aráceas por Daquinta et al. (2001, 2007) respectivamente.

Como resultado de este experimento se seleccionó la frecuencia de inmersión de cada cuatro horas, es decir seis inmersiones por día, para continuar con el estudio del cultivo en inmersión temporal y evaluar otros factores que eleven la eficiencia biológica en esta especie.

Efecto del Paclobutrazol (PBZ)

Se comprobó que la adición de PBZ al medio de cultivo influyó en la proliferación y calidad de los brotes de *Zantedeschia* spp. en SIT. Se observó que en dependencia de la concentración de PBZ presente en el medio de cultivo, hubo diferencias significativas en el coeficiente de multiplicación, número de hojas por brotes y altura (Figura 2). Los mejores resultados en coeficiente de multiplicación se obtuvieron con 0.3 mg.l⁻¹ de PBZ con un promedio de 9.7 brotes por explante.

En cuanto al número de hojas y altura de los brotes, el tratamiento sin PBZ fue el de mejores resultados (Figura 2). En el número de hojas por brote el aumento fue de 0.55 con respecto al tratamiento con 0.6 mg.l⁻¹ de PBZ. En cuanto a la altura de los brotes se observó incremento en el control, respuesta característica de la ausencia del retardante del crecimiento.

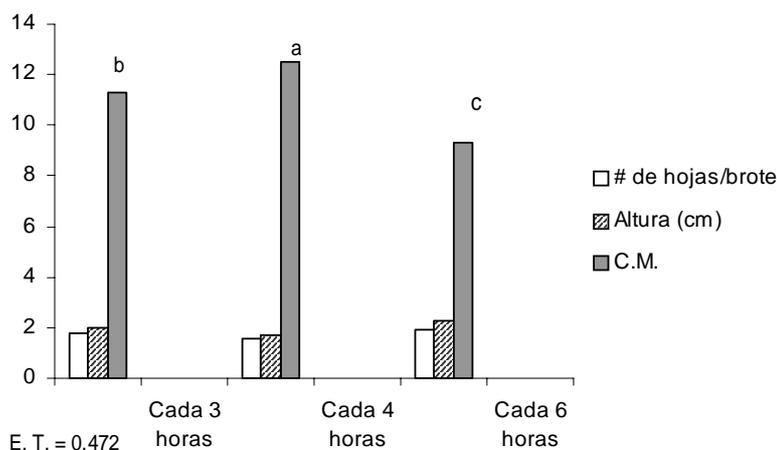


Figura 1. Efecto de la frecuencia de inmersión sobre el coeficiente de multiplicación de *Zantedeschia* spp. variedad Treasure en SIT a los 28 días de iniciado el cultivo (Barras con letras iguales, las medias no difieren significativamente según pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y C Dunnett, para $p \leq 0.05$)

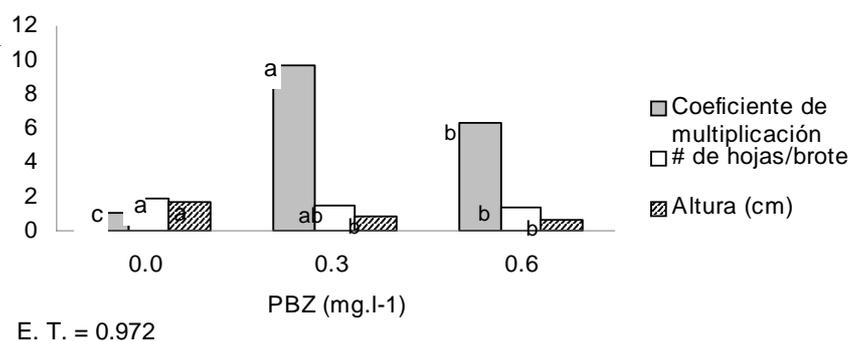


Figura 2. Efecto del Paclobutrazol (PBZ) sobre el coeficiente de multiplicación de *Zantedeschia* spp. variedad Treasure en SIT a los 28 días de iniciado el cultivo (Barras de una misma variable con letras diferentes, las medias difieren significativamente, según pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y C Dunnet, para $p \leq 0.05$).

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). Por tanto, las diferencias observadas en la altura del explante se justifican por la presencia o no de este retardante del crecimiento.

Un efecto sinérgico del BAP y PBZ sobre la multiplicación y la longitud de los brotes de *Spathiphyllum floribundum* fue observado por Werbrouck y Debergh (1996). En este caso, la combinación de BAP con PBZ presentó un efecto sinérgico sobre la proliferación y crecimiento de los brotes de *Zantedeschia*. En la figura 2 se observa un sinergismo en el tratamiento que incluye 4 mg.l⁻¹ de BAP como base y 0.3 mg.l⁻¹ de PBZ, en relación con el coeficiente de multiplicación.

Tefera y Wannkrajro (2006) encontraron que la adición de PBZ al medio de cultivo tiene un efecto considerable. Continúan señalando que este retardante del crecimiento a 3 mg.l⁻¹ produjo el mayor número de brotes y masa seca en las plántulas de *Aframomum corrorima* (Braun) Cansen. El uso combinado de citoquininas y PBZ en el medio de cultivo tuvo un efecto sinérgico sobre el número y longitud de los brotes, así como en la masa seca de las plantas, concluyen estos autores. Recientemente Ziv (2008) logró incrementos en el número de *cluster* meristemáticos de *Ornithogalum dubium* Hout con el empleo de 0.7 mg.l⁻¹ de PBZ conjuntamente con las citoquininas.

CONCLUSIONES

Se logró multiplicar *in vitro* *Zantedeschia* spp. variedad Treasure en Sistemas de Inmersión Temporal. Los mejores resultados se obtuvieron con una frecuencia de inmersión cada cuatro horas y el empleo el medio de cultivo con 0.3 mg.l⁻¹ de PBZ (9.7 brotes por explante).

REFERENCIAS

- Chang H, Chakrabarty D, Hahn E, Paek, K (2003) Micropropagation of Calla Lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant*. 36:129-134
- Chen, J, Liu M, Ho Y (2000) Size on *in vitro* plantlets affects subsequent tuber production of acclimatized calla lily. *HortScience* 35(2):290-292
- Clemens, J, Welsh, T (1993) An overview of the New Zealand calla industry, research direction and year round tuber production. *Acta Horticulturae* 337:161-316
- Cohen, D (1981) Micropropagation of *Zantedeschia hybrids*. *Combined Proc. Int. Plant Pro. Soc.* 31:312-316
- Daquinta, M, Espinosa, P, Escalona M, Rodríguez R, Guerra M (2001) Bromeliad micropropagation in Temporary Immersion System. *Journal of the Bromeliad Society* 51(2): 80-85
- Daquinta, M, Mosqueda, O, Gonzalez, M T, Benega, R, y Texeira da Silva, J A (2007) Shoot Proliferation of *Caladium x hortulanum* in a Temporary Immersion System. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 1(1): 70-72
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Dejardins Y, Borroto CG (1999)

- Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18(9): 723-748
- Etcheverría, P (2002) Efecto de la densidad de sombra y del mulch en la producción y calidad de flores y túberos de *Zantedeschia hybrida* cv. Mango. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de la Frontera. 67 p.
- Etienne, H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215–231
- Fang, W L, Xiong L, Qu Y H, Qu S P (1999) Tissue culture of colored common calla lily. *J. South West Agricultural University* 21: 423-426
- Funnell, K, Hewett E, Warrington I, Pummer J (1998) Leaf mass partitioning as a determinant of dry matter accumulation in *Zantedeschia*. *Journal American Society Horticultural Science* 123(6): 973-979
- Murashige, T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-487
- Rademacher, W (2000) Growth retardants: Effects on Gibberellins biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annuals Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 501-531
- Ruffoni, B, Savona, M, Doveri, S, Pamato, M, Laura, M, Rabaglio, M y Brea, M (2002) Propagazione *in vitro* di un genotipo a taglia ridotta di *Zantedeschia aethiopica*. Proc VI Giornate Scientifiche SOI, Workshop 75-76
- Ruffoni, B, Savona, M (2005) The Temporary Immersion System (T.I.S.) for the Improvement of Micropropagation of Ornamental Plants. *Acta Horticulturae*. 683: 445-449
- Tefera, W, Wannakraioj S (2006) Synergistic effects of some plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of korarima (*Aframomun corrorima* (Braun) Jansen). *African Journal of Biotechnology* 5(10): 1894-1901
- Werbrouck, S, Debergh P (1996) Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in Araceae. *Journal Plant Growth Regulator* 15:81-85
- Ziv, M (2008) Paclobutrazol and Xantahn Gum involvement in proliferation and stress response of *Ornithogalum dubium* Houltt bud clusters cultured in bioreactors. *Propagation of Ornamental Plants* 8(1): 28-32