

## Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada

Nydia del Rivero Bautista<sup>1\*</sup>, Elisa Quiala<sup>1</sup>, Daniel Agramante<sup>1</sup>, Raúl Barbón<sup>1</sup>, Wilder Camacho<sup>2</sup>, Lester Morejón<sup>1</sup> y Marta Pérez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuani km 5½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: delriverobautista@yahoo.com.mx

<sup>2</sup>Dirección General de Estudios Tecnológicos Agropecuarios (DGETA). Carretera Cumuapa, Cunduacán, Tabasco, México.

### RESUMEN

Dos métodos para mejorar la eficiencia en la multiplicación de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind., fueron empleados para optimizar las frecuencias de inmersión de los explantes utilizando un Sistema de Inmersión Temporal. La relativa eficiencia del método convencional de cultivo en medio de cultivo semisólido para la multiplicación de brotes se comparó con el método de Sistema de Inmersión Temporal. El más alto índice de multiplicación de brotes se alcanzó con seis inmersiones al día cada cuatro horas durante dos minutos. Controlando los ciclos de inmersión se lograron plantas mejor desarrolladas y mayor coeficiente de multiplicación. Las plántulas multiplicadas a través de este método fueron cosechadas con 2 a 3 cm de longitud y de dos a cinco hojas después de un período de cultivo de 50 días. La formación de callos, hiperhidricidad y otras anomalías no se observaron durante el proceso. Las plántulas obtenidas por este método fueron llevadas a enraizamiento en medio de cultivo semisólido. Este sistema evita riesgos de contaminación microbiana, aumenta rendimientos, reduce costos de mano de obra y de contenedores. Esta técnica por su relación beneficio-costo tiene significativas implicaciones para la propagación comercial del *Anthurium*.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, medios de cultivo, plántulas

### ABSTRACT

Two methods to improve the efficiency in the multiplication of shoots of *Anthurium andraeanum* Lind., they were used to optimize the frequencies of immersion of the explants using a System of Temporary Immersion. The relative efficiency of the method conventional means of culture semisolid for the multiplication of shoots was compared with the method of System of Temporary Immersion. The highest rate of multiplication of shoots was reached using six immersions four times a day during two minutes, controlling the immersion cycles achieves plants better developed and bigger multiplication coefficient. The plantlets multiplied through this method were harvested with 2 to 3 cm of longitude containing from two to five leaves after a period of culture of 50 days. The formation of callus, hiperhidricity and other abnormalities were not observed during the process. The plants obtained by this method were taken to rooting in medium of culture semisolid. This system avoids risks of contamination, it increases yields, it reduces manpower costs and of containers. This technique for its relationship benefit-cost has significant implications for the commercial propagation of the *Anthurium*.

Key words: Culture medium, multiplication rate, plantlets.

### INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia de las *Araceae* el género *Anthurium* es el más popular y económicamente importante; estos son producidos y comercializados como flores de corte y plantas de maceta por lo vistoso de sus flores y follaje (Kuenhle, 1992). El método convencional de propagación de *Anthurium* es por semilla, pero éstas no pueden almacenarse y el tiempo de desarrollo de las plantas es muy largo. Las plantas propagadas por semillas presentan heterogeneidad (Geier, 1990). Muchos laboratorios comerciales de cultivo de tejidos utilizan técnicas de propagación por multiplicación de yemas; sin embargo, existen problemas de contaminación microbiana; además

el índice de multiplicación es bajo (Hamidah, 1997). El desarrollo de un método que mejore este último aspecto para material vegetal élite de *Anthurium* es una contribución importante para países en vías de desarrollo.

Una técnica viable para la propagación de plantas ornamentales es la utilización de Sistemas de inmersión temporal (SIT) ya que los efectos positivos proporcionados por la misma en la multiplicación de brotes, microcortes, microtubérculos y germinación de embriones somáticos está limitada por factores como el tiempo de la inmersión (duración y frecuencia), el volumen del medio de cultivo y el volumen del recipiente, los cuales pueden, de una u otra forma, ser controlados

por el investigador. La inmersión temporal mejora generalmente la calidad de la planta al aumentar el vigor del brote producido. La hiperhidricidad que afecta las especies en el medio de cultivo líquido puede eliminarse con estas técnicas (Hamidah *et al.*, 1996; Berthouly y Etienne, 2002). Numerosos sistemas automatizados para la propagación *in vitro* basados en la adición y eliminación de medio de cultivo líquido han sido desarrollados por Tisserat y Vandercook (1985), Aitken-Christie y Jones (1987) y Aitken-Christie y Davies (1988). Alvard *et al.* (1993) demostraron la aplicación potencial de los sistemas de inmersión temporal por primera vez en la micropropagación de banano.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización de los Sistemas de inmersión temporal para la multiplicación de brotes de *A. andraeanum* Lind.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y condiciones de cultivo

Los explantes utilizados en esta investigación fueron brotes obtenidos a partir de callos formados *in vitro* en hojas jóvenes de *A. andraeanum* Lind según Pierik (1976) (Figura 1). La variedad utilizada fue Lambada y las plantas donantes se obtuvieron en la empresa Varafior, en la Provincia de Matanzas, Cuba.

El medio de cultivo utilizado contenía las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100%, suplementadas con 1.0 mg. l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y 2.5 g.l<sup>-1</sup> de Gelrite como gelificante. Para los Sistemas de inmersión temporal el medio de cultivo empleado fue en estado líquido y para el control en estado semisólido. El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.8 y esterilizado a 1.2 kgf.cm<sup>-2</sup> durante 25 minutos para el medio de cultivo en estado líquido y 20 min para el medio de cultivo en estado semisólido. Los cultivos fueron incubados en

cámara de luz solar con una densidad de flujo de fotones sintéticos (DFFF) que oscilaron entre 100-125  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $28\pm 2$  °C.

### Descripción del Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

El sistema fue diseñado con dos frascos de vidrio (Erlenmeyers) con un volumen cada uno de 1.0 litro. Se empleó un frasco que contenía los explantes y el otro funcionaba como reservorio del medio de cultivo. Ambos frascos estaban conectados uno del otro por medio de un tubo de silicona que fue insertado a través de la cubierta de cada recipiente y descendía hacia el fondo del frasco permitiendo el intercambio del medio de cultivo. El sistema contó con una conexión a través de filtros hidrofóbicos de 0.2  $\mu\text{m}$  que garantizaban la esterilidad con la entrada del aire, mientras la presión del aire era controlada por un manómetro y el tiempo de inmersión era regulado por un software Biosys el cual controla dos válvulas eléctricas de tres pasos que permiten indistintamente la circulación de aire cuando abren y consecuentemente la circulación del medio de cultivo de un frasco a otro.

### Efecto de la frecuencia de inmersión en la multiplicación de brotes

Se emplearon SIT con 500 ml de medio de cultivo líquido y brotes de plantas cultivadas *in vitro* con cuatro subcultivos. En cada SIT se colocaron 20 brotes como inóculo y se evaluó el efecto de las frecuencias de inmersión (cuatro y seis inmersiones por día) sobre la cantidad final de brotes obtenidos.

Los SIT se colocaron en cámara de crecimiento de luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que oscilaron entre 100-125  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $28\pm 2$  °C.



Figura 1. Brotes de *A. andraeanum* Lind obtenidos a partir de callos.

Después de 50 días de cultivo se evaluó el número promedio de brotes por sistema y el coeficiente de multiplicación se determinó dividiendo el número final de brotes obtenidos entre el número inicial de brotes colocados en cada SIT. También se evaluó la altura de las plantas (cm).

Los resultados fueron comparados con un tratamiento control en medio de cultivo semisólido en el cual se multiplicaron brotes de la misma especie vegetal mediante la metodología descrita por Pierik (1976) para la micropropagación de *Anthurium andraeanum* Lind., vía organogénesis para la fase de multiplicación.

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México (FAUANL) (Olivares, 1995). Los mismos se analizaron por medio de un ANOVA simple. Para detectar las diferencias entre las medias de los tratamientos a un nivel de significación del 5% se usó la prueba DMS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la frecuencia de inmersión en la multiplicación de brotes

En todos los tratamientos que se encontraban en SIT la formación de nuevos brotes se estimuló, así como el incremento en la altura de las plantas con respecto al control en medio de cultivo semisólido (Tabla 1).

Los intervalos de tiempo en la inmersión tuvieron un impacto significativo sobre el coeficiente de multiplicación de los brotes en el Sistema de inmersión temporal. El mayor coeficiente de multiplicación se obtuvo cuando se utilizó una frecuencia de seis inmersiones al día (Tabla 1); además el número de brotes y longitud de las plantas mostraron un mejor desarrollo expresado en la calidad de las plantas.

Usando esta frecuencia de inmersión el incremento en el número de brotes fue mayor que en el tratamiento donde se utilizaron cuatro inmersiones al día y el control.

En la frecuencia de inmersión de cuatro veces al día el coeficiente de multiplicación de los brotes disminuyó. De esta forma los intervalos de tiempo de inmersión juegan un papel decisivo en los coeficientes de multiplicación, esto concuerda con Berthouly y Etienne (2002) quienes afirmaron que la duración o frecuencia de inmersión es el parámetro más importante para la eficiencia del sistema y la inmersión también mejora la calidad del material vegetal produce un incremento en el vigor del brote o en el desarrollo de la planta y reduce la hiperhidricidad (Ziv, 2002) (Figura 2A).

Al comparar el Sistema de inmersión temporal con el método convencional se observó que el coeficiente de multiplicación de brotes difirió entre los dos métodos probados. En el SIT se alcanzó un coeficiente de multiplicación de cerca de cuatro y ocho veces superior, en dependencia del número de inmersiones, al método convencional (Tabla 1). En el tratamiento donde se realizaron inmersiones seis veces al día se alcanzó el coeficiente más alto de multiplicación de los brotes con respecto al tratamiento de cuatro inmersiones al día y con el control en medio de cultivo semisólido. Este resultado se fundamenta según Debergh y Maene (1981), Robert y Smith (1990) y Preil y Hempfling (2002) en que los cultivos que se encuentran en medio de cultivo líquido la superficie del explante entra en contacto directo con el medio de cultivo lo que permite la captación más eficaz de nutrientes y liberar los metabolitos tóxicos que pudieran acumularse en el área del tejido que se dispersan más eficientemente en el medio de cultivo líquido que en el semisólido.

En este estudio no se observaron anomalías en los brotes formados (Figura 2A). Hamidah *et al.* (1996) utilizando diferentes tipos de explantes (meristemoides, cultivo de brotes retardados, embriogénesis somática y nódulos) en medio de cultivo líquido para reducir los costos de producción y aumentar la propagación masiva; no observaron diferencias fenotípicas ni genotípicas en las plántulas obtenidas a través de los diferentes sistemas de regeneración *in vitro*. Estos autores concluyeron que estos cultivos son multiplicados rápidamente en medio de cultivo líquido y mantienen su estabilidad genética.

Tabla 1. Efecto de la frecuencia de inmersión durante el cultivo de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada en Sistemas de Inmersión Temporal.

Tratamientos (Inmersiones por día)	No. de brotes	Altura de las plantas (cm)	Coeficiente de multiplicación
4	15.5±1.02 <sup>b</sup>	1.17±0.070 <sup>b</sup>	8.66±0.608 <sup>b</sup>
6	25.5±1.92 <sup>a</sup>	1.44±0.074 <sup>a</sup>	17.63±1.42 <sup>a</sup>
Control en medio de cultivo semisólido	2.75±1.7 <sup>c</sup>	0.80±0.05 <sup>c</sup>	2.87±1.68 <sup>c</sup>

Valores de medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para  $p < 0.05$  de acuerdo con la prueba DMS.

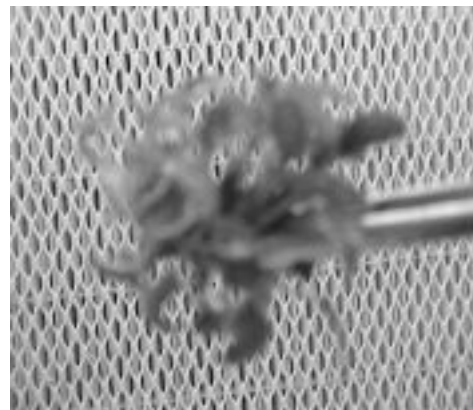
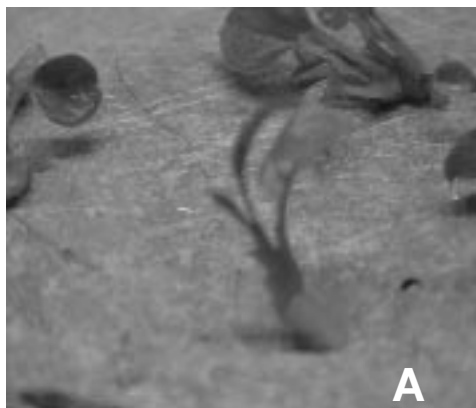


Figura 2. Brotes de *A. andraeanum* Lind. (A) Brote individualizado sin malformaciones (B) Conjunto de brotes a partir de un brote inicial.

## CONCLUSIONES

Fue posible multiplicar brotes de *A. andraeanum* Lind., variedad Lambda en SIT. En el mismo se obtuvieron coeficientes de multiplicación mayores en comparación con el método convencional que emplea el medio de cultivo en estado semisólido.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores dejan explícito su agradecimiento a ANUIES por el soporte financiero de la beca doctoral de la autora principal de la cual forma parte este resultado.

## REFERENCIAS

- Aitken-Christie J y Jones C (1987) Towards automation: Radiata pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 8: 185-196
- Aitken-Christie J y Davis H (1988) Development of a semi-automated micropropagation system. *Acta Hort* 230: 81- 87
- Akula, A, Becker D y Bateson M (2000) High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. *Plant Cell Reports* 19:1140-1145
- Alvard, D, Cote F y Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effect of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 32: 55-60
- Berthouly, M y Etienne H (2002) Temporary Immersion System: A new concept for use liquid medium in mass propagation. 1<sup>st</sup> Int. Symp. "Liquid Systems for *in vitro* Mass Propagation of Plants", As, Norway
- Debergh, P y Maene L (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort* 14: 335-345
- Hamidah, M, Abdul Karim AG y Debergh PC (1996) Mass propagation of *Anthurium* by the use of *in vitro* technique. Second Ph.D. Symposium. Faculteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent
- Hamidah, M, Abdul Karim AG y Debergh PC (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 189-193
- Kuehnle, RA, Chen FCH y Sugii N (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. *Plant Cell Reports* 11: 438-442
- Olivares, SE (1994) Paquete de diseños experimentales. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N L
- Preil, W y Hempfling T (2002) Application of Temporary Immersion System in Propagation of *Phalaenopsis*. 1<sup>st</sup> Int. Symp. "Liquid Systems for *in vitro* Mass Propagation of Plants", As, Norway
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-497
- Robert, AV, y Smith EF (1990) The preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplantation to soil. I. Protection of roots by cellulose plugs. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 21:129-132
- Tisserat, B, y Vandercook CE (1985) Development of an automated plant culture system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 5:107- 117
- Ziv, M (2002) Simple Bioreactors for Mass Propagation of Plants. 1<sup>st</sup> Int. Symp. "Liquid Systems for *in vitro* Mass Propagation of Plants", As, Norway