

PROPAGACION IN VITRO DE *VRIESEA* EN BIT.

Iris Capote*, Maritza Escalona, Marcos Daquinta, Danilo Pina, Justo Gonzalez, Carlos Aragon.
Centro de Bioplantas, UNICA, Carretera a Moron, km 9 Ciego de Ávila.
icapote@bioplantas.cu

RESUMEN.

Las bromelias son plantas ornamentales muy atractivas por la coloración de sus hojas y la belleza de sus inflorescencias. Dentro de ellas las *Vrieseas* es uno de los géneros de mayor interés comercial. Cuando se desean introducir nuevos híbridos en el mercado, las técnicas de propagación tradicional son insuficientes, por lo que resultan de gran interés las técnicas de propagación *in vitro*. Con el objetivo evaluar diferentes condiciones de cultivo para la propagación *in vitro* de la *Vriesea* con la implementación de la técnica de inmersión temporal, se evaluó el efecto del volumen de medio de cultivo/explante en la proliferación y calidad de los brotes de *Vriesea* en el BIT; el efecto del corte de los brotes (manejo del explante) previo a la inoculación en el BIT en la proliferación y calidad de los brotes, y la aclimatación de los brotes y el efecto de la aplicación del análogo de Brasinoesteroides (MH5) en la supervivencia y en los indicadores morfológicos de calidad de las plantas. La integración de los resultados constituyen los procedimientos elementales para un protocolo de propagación de *Vriesea* con el empleo de la técnica de inmersión temporal.

INTRODUCCIÓN.

Las Bromelias se propagan de forma natural a través de la vía sexual como de la asexual, pero ambas vías presentan desventajas. El desarrollo de las técnicas de micropropagación ha tenido resultados altamente ventajosos en la propagación rápida y con calidad de genotipos élites. Todos estos protocolos presentan como desventajas los bajos coeficientes de multiplicación, el alto costo de la mano de obra y la escasa posibilidad de automatización. Es por ello, que se han venido desarrollando nuevos métodos de propagación con el empleo de medio líquido.

La técnica de inmersión temporal ha demostrado que reduce algunos problemas usualmente encontrados con el empleo del cultivo en medio líquido, como son la pobre calidad del propágulo y la necesidad de trasplante a un medio sólido en los estados de elongación y/o enraizamiento.

Por lo general, el cultivo en inmersión temporal aumenta la tasa de multiplicación y mejora la calidad morfológica intrínseca de los brotes. La caracterización fisiológica de las plantas en esa nueva forma de cultivo ha demostrado una baja capacidad fotosintética y una mayor asimilación de nutrientes en la piña (Escalona et al., 2003); así como un mejoramiento en el cultivo mixotrófico de los brotes de plátano previo a la aclimatación (Aragón et al., 2005). Por lo general, los estudios de la fisiología de las plantas han demostrado que bajo esta forma de cultivo los brotes incrementan su biomasa y por ende las sustancias de reserva que permiten enfrentar las condiciones de estrés a que van a estar expuestos en el tránsito a la fase *ex vitro*.

El presente trabajo se desarrollo con el objetivo de evaluar diferentes condiciones de cultivo para la propagación *in vitro* de la *Vriesea* con la implementación de la técnica de inmersión temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Como material vegetal se utilizaron plantas cultivadas *in vitro* de un híbrido de *Vriesea*, Bromelia Ornamental, proveniente del Laboratorio Comercial SBW de Holanda.

El mismo consistió en separar grupos de 2-3 brotes de los agregados, las hojas de los brotes se removieron y se cortaron a una altura de 1.5 cm desde la base

Se emplearon BIT previamente descritos por Escalona et al., (1999). Las condiciones de cultivo en el estante de inmersión temporal fueron de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, un flujo de

Fotones Fotosintéticos de 30-40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y un foto período de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

El coeficiente de multiplicación se determinó por el cociente del número final de brotes entre el número inicial de brotes que se inocularon. Como indicadores de calidad se evaluaron presencia de brotes hiperhídricos, coloración de los brotes, altura de los brotes, número de hojas por brote, número de raíces por brote, así como la masa fresca y la masa seca.

Para el análisis estadístico se utilizó el utilitario estadístico SPSS (versión 11.5 para Windows).

RESULTADOS Y DISCUSION.

Efecto del volumen de medio de cultivo/explante en la proliferación y calidad de los brotes de *Vriesea* en el BIT.

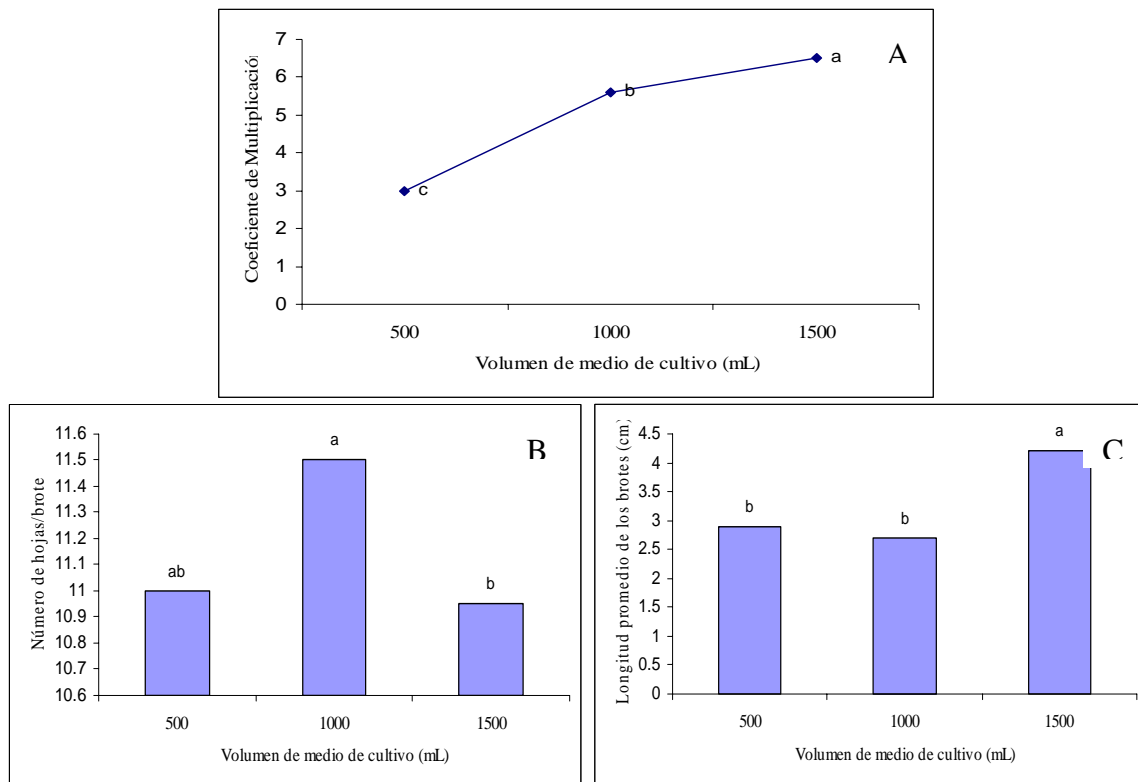


Figura 1. Efecto del volumen de medio de cultivo en el coeficiente de multiplicación(A) y los indicadores de calidad de los brotes de *Vriesea* (B,C) después de ocho semanas de proliferación y quince días de elongación en medio MS en BIT. Los datos representan la media de tres BIT/tratamiento en el que fueron evaluados todos los brotes(A). Kruskal-Wallis $p \leq 0.05$, (B,C) Anova, Tukey. Letras diferentes indican significación por el Student-Newman-Keuls.

Al ensayar diferentes volúmenes de medio de cultivo en el BIT durante la fase de proliferación de los brotes de *Vriesea* se pudo observar que este factor tuvo un marcado efecto sobre los indicadores morfogénicos y de calidad que se evaluaron. El coeficiente de multiplicación aumentó en correspondencia con el incremento en el volumen de medio de cultivo lográndose el máximo valor (6.2) con el empleo del volumen de 1500 mL el cual difirió significativamente del resto de los tratamientos. Los brotes con mayor número de hojas se presentaron en los tratamientos de 500 y 1000 mL de medio de cultivo, sin diferencias estadísticas entre ambos. Sin embargo los brotes expuestos al volumen de 1500 mL lograron un aumento significativo en la longitud.

Tabla 1. Efecto del volumen de medio de cultivo en el porcentaje de plantas competentes para la aclimatización.

Clases (cm)	Volumen de medio de cultivo/BIT (mL)		
	500	1000	1500
1.5-2.9	462	1043	741
3.0-4.4	432	531	1075
4.5-5.9	0	9	0
Total de plantas	894	1583	1816
Porcentaje de brotes competentes	48.0	34.0	60.0
Porcentaje de brotes no competentes	51.7	65.8	40.8

Los datos representan el total de plantas por tratamiento (3 BIT). Todos los brotes se agruparon en función de su tamaño en clases. Los brotes competentes según instructivo técnico de la SBW son aquellos mayores de 3.0 cm.

Al analizar el efecto del volumen de medio de cultivo sobre el porcentaje de brotes competentes se determinó que el tratamiento de mayor volumen de medio 1 500 mL fue el que logró un mayor número de plantas competentes alcanzando valores del 60 %.

El contenido de nutrientes en el medio de cultivo puede variar producto de cambios en la concentración o por cambios en el volumen de medio a una concentración fija de nutrientes (Kozai et al., 1995).

Efecto del corte de los brotes de *Vriesea* (manejo del explante) previo a la inoculación en el BIT en la proliferación y calidad de los brotes.

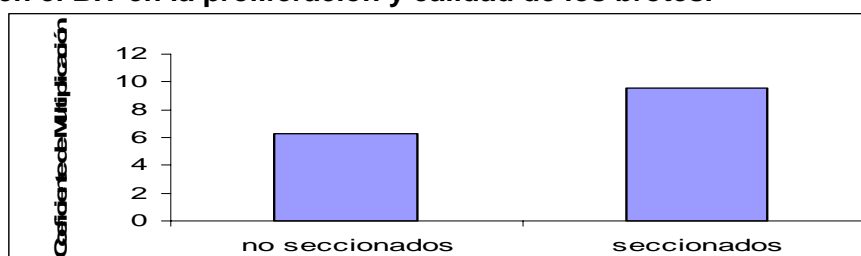


Figura 2. Efecto del seccionado y no seccionado de los brotes de *Vriesea* previa a la inoculación en el BIT en el coeficiente de multiplicación. Los datos representan la media de tres repeticiones (3 BIT/tratamiento). Las medias fueron comparadas con una prueba Mann-Whitney para un grado de significación del 5 % (n=3) (ES=22.08).

El seccionado de los brotes individuales de *Vriesea* previo al cultivo en el BIT provocó una disminución de la dominancia apical de los brotes y como consecuencia una estimulación de la brotación axilar.

En el cultivo de brotes es importante estimular el crecimiento de brotes laterales, pero los genotipos varían en su grado de dominancia apical, algunos producen pocos brotes largos mientras otros tienen brotes más cortos, pero algunos laterales siempre se forman. Este fenómeno se explica a que en algunos genotipos con una fuerte dominancia apical presentan un alto contenido endógeno de auxinas naturales o una mayor sensibilidad a los sistemas receptores de auxinas (George, 1993).

Tabla 2: Efecto del seccionado y no seccionado de los brotes de *Vriesea* (manejo del explante) en la calidad morfológica de los brotes después de ocho semanas de proliferación y 15 días de elongación en medio MS.

Manejo del explante	Longitud promedio de los brotes(cm)	Número de hojas/brote	Masa fresca/brote)	Masa seca/brote (g)
Seccionados	3,42	11,66	0,58	0,09
Sin seccionar	3,61	11,25	0,58	0,06
ES	0,08	0,08	0,35	0,05
Significación	NS	*	NS	*

Las medias fueron comparadas con una prueba T-Student para un grado de significación del 5 % (n=105).

Aclimatización de los brotes de *Vriesea*. Efecto de la aplicación del análogo de Brasinoesteroides (MH5) en la supervivencia y en los indicadores morfológicos de calidad de las plantas.

Tabla 3: Efectos de las aplicaciones del análogo de brasinoesteroides MH5 sobre la supervivencia de las plantas de *Vriesea* durante los 49 días en la fase de aclimatización.

Concentración de MH5 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Supervivencia (%)			
	7 días	14 días	28 días	49 días.
0.0	100	97.00	87.00 b	66.00 b
0.021	100	98.00	96.00 a	88.00 a
0.107	100	97.00	92.00 a	84.00 a
0.216	100	99.00	95.00 a	87.00 a
ES	0.00	7.32	7.84	8.16
Significación.	NS	NS	*	*

Medias con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas para un grado de confiabilidad del 5% para la prueba de Student-Newman-Keuls. (n=3).

Tabla 4: Efecto de las aplicaciones del análogo de brasinoesteroides MH5 sobre la calidad morfológica de los brotes de *Vriesea* a los 49 días de la fase de aclimatización.

Concentración de MH5($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Longitud/brote	Número de raíces/brote	Número de hojas/brote	Masa fresca/brote g)	Masa seca/brote (g)
0.0	5.16	1.89 b	11.3 b	0.39 b	0.03
0.021	5.04	3.06 a	11.9 ab	0.34 b	0.04
0.107	5.05	2.62 a	12.1 ab	0.42 ab	0.04
0.216	5.36	3.00 a	12.7 a	0.50 a	0.04
ES	0.08	0.09	0.15	0.01	0.001
Significación	NS	*	*	*	NS

Medias con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas para un grado de confiabilidad del 5% para la prueba de Tukey (n=30).

En el proceso de aclimatización de las plántulas de *Vriesea*, las primeras muertes se detectaron a partir de los 28 días. Esta evidencia de adaptabilidad durante los primeros momentos de la salida *ex vitro*, presumiblemente se debe a la alta capacidad de almacenaje de agua y una mayor eficiencia en la utilización de la misma, característica fisiológica importante en la familia Bromeliaceae (Medina et al., 1989).

La aparición de plantas muertas al final de la etapa de aclimatización (49 días) pudiera estar relacionada con la inanición de las mismas por agotamiento de nutrientes en el sustrato u otras condiciones necesarias a manipular en esta fase como son los niveles de luminosidad, temperatura, humedad relativa y fotoperíodo.

Las plantas que fueron asperjadas con MH5 mostraron la menor mortalidad. Esto pudiera estar relacionado con las propiedades anti-estrés de este regulador.

La mayor concentración de brasinoesteroides provocó un aumento significativo de la masa fresca de los brotes en comparación con el valor alcanzado por este indicador en los grupos control y MH5 $0.021 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Los cambios que se inducen en el crecimiento y desarrollo de las plantas por la aplicación de los brasinoesteroides son el resultado de una cascada de eventos bioquímicos, los cuales pueden ser iniciados directamente sobre el genoma o a través de rutas que no impliquen la acción directa de los genes (Khripach *et al*, 2000).

El volumen de medio de cultivo tuvo una marcada incidencia en la morfogénesis *in vitro* así como en la longitud de los brotes y por ende en el porcentaje de plantas de *Vriesea* competentes para la aclimatización. El seccionado de los brotes individuales de *Vrieseas* previo al cultivo en el BIT estimuló la brotación axilar por lo que el proceso de aclimatización de las plantas de *Vriesea* provenientes del cultivo en inmersión temporal; la aplicación de auxinas (polvo enraizador) y del brasinosteriodes MH5 promovió la calidad morfológica de las mismas, lo cual se tradujo en un mayor número de raíces, número de hojas y masa fresca de los brotes.

BIBLIOGRAFIA.

.Aragón, C. E.; Escalona, M.; Capote, I.; Pina, D.; Cejas, I.; Rodríguez, R.; Cañal, M. J.; Sandoval, J.; Roels, S.; Debergh, P; González-Olmedo, J. L. 2005. Photosynthesis and carbon metabolism in Plantain (*Musa AAB*) growing in Temporary Immersion Bioreactor (TIB) and *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41 (4):550-554.

.Escalona, M.; Lorenzo, J. C.; González, B.; Daquinta, M.; González J L, Dejardins, Y, Borroto, C. G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Repor* 18:9, 723-748.

Escalona, M.; Samson, G.; Borroto, C.; Desjardins, Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion biorreactores of micropropagated pineapple plantlets. 39 (6):651-656.

George, E. F. 1993 *Plant propagation by tissue culture*. Part 1. 2da Edition. Exergetics 1. 574p.

Kozai, T.; Jeon, B. R.; Kubota, C. H.; Murai, Y. 1995. Effects of volume and initial strenght of medium on the growth. Photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. *J. Japan. Soc, Hort. Sci.* 64(1):63-71.

Khripach, V.; Zhabins, K. Z. ; Groot, A. 2000. Botanical Briefing. *Annals of Botany.* 86: 441-447.

Medina, E.; Olivares, E.; Diaz, M.; Van der Merwe, N. 1989. Metabolismo acido de crasuláceas en bosques húmedos tropicales. *Monographs in Systematic Botany (Missouri Botanical Garden)* 27: 56-67.