

Establecimiento de un sistema de inmersión temporal para la micropropagación y el enraizamiento de *Bergenia* spp var. Herbstblüte

Manfred Murrell ¹

Dora Flores ²

Oscar Azofeifa ³

Introducción

Existe gran cantidad de empresas en el mundo dedicadas a la micropropagación comercial; algunas de ellas producen más de 200 000 plantas *in vitro* por semana, de especies ornamentales, frutales y forestales. En Costa Rica, las empresas se dedican en su mayoría a la producción de plantas ornamentales, raíces y tubérculos.

Tradicionalmente, la producción de vitroplantas en estos laboratorios emplea un medio de cultivo semisólido, con bajas densidades de siembra y con limitaciones de producción, debido a los requerimientos de espacio y al empleo de gran cantidad de mano de obra, lo cual incrementa los costos y trae como consecuencia una menor eficiencia económica (Preil *et al.*, 1988).

Por medio de la implementación del sistema de inmersión temporal, se pretende incrementar la productividad y calidad del material vegetal en períodos de tiempo más cortos. Bajo esta perspectiva, el uso de técnicas de producción automatizadas facilita las etapas de micropropagación y de enraizamiento como, por ejemplo, los recipientes de inmersión temporal (RITA) diseñados para el cultivo de células y órganos vegetales (Fig. 1).

El objetivo de esta investigación fue implementar un sistema de inmersión temporal para la micropropagación y el enraizamiento de *Bergenia* spp var Herbstblüte.

Palabras clave

Bergenia spp, inmersión temporal, medio de cultivo líquido, micropropagación, RITA.

1. Ingeniero en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. E-mail: mmurrell@una.ac.cr

2. Profesora Investigadora del Instituto Tecnológico de Costa Rica. E-mail: dflores@itcr.ac.cr

3. Laboratorio Innovaplant de Costa Rica, S.A. E-mail: innovala@racsa.co.cr

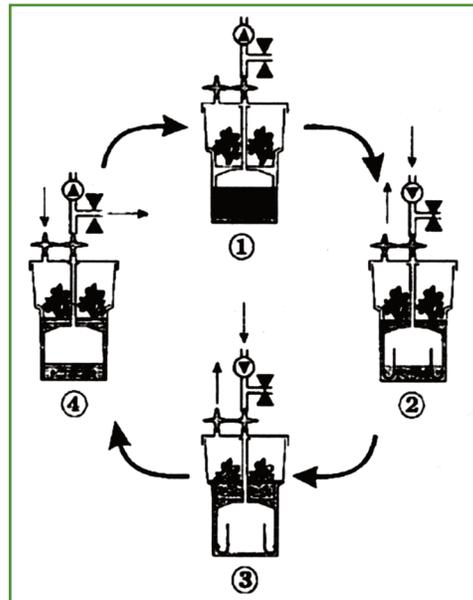


Figura 1
Sistema de inmersión temporal
 (Teisson *et al.*, 1996).

Materiales y métodos

Instalación del equipo y evaluación de las condiciones de asepsia

El sistema de inmersión temporal requiere un compresor industrial como fuente de aire, válvulas para la regulación de la presión y filtros especiales para su utilización a nivel comercial. sin embargo, para realizar este estudio se dispuso del siguiente equipo: inyector de aire, mangueras, conectores de 3 salidas y tuberías (uniones “t”).

Para la desinfección del equipo todos los componentes, excepto los filtros milipore, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1,16% por un período de dos horas, luego se lavaron con agua y jabón. Posteriormente se escurrieron sobre un papel absorbente, una vez secos se

ensamblaron los recipientes, se colocaron los filtros y se adicionó el medio de cultivo. Los RITA se autoclavaron por un período de 20 minutos a 121 °C, a una presión de 15 libras (103,4 KPa).

Material vegetal

El material inicial para los ensayos consistió en plántulas individuales de *Bergenia spp* var *Herbstblüte* de cuatro semanas de cultivo en medio semisólido, con un peso aproximado de 0,05 g por vitroplanta. Se estableció un fotoperíodo de 16 horas luz, una intensidad lumínica de 3000 lux y una temperatura de 20 °C.

El efecto de los tratamientos bajo el sistema de inmersión temporal fue evaluado después de un período de cuatro semanas.

Tratamientos

La investigación se dividió en dos etapas: micropropagación y enraizamiento. Para la etapa de micropropagación se establecieron dos ensayos, el primero con tres tratamientos y el segundo con dos tratamientos.

Etapa de micropropagación⁴

Ensayo I

- *Tratamiento 1:* Medio M&S al 100% + 0,2 mg/l de 6-BAP + 0,2 mg/l de AIA.
- *Tratamiento 2:* Medio M&S al 75% + 0,2 mg/l de 6-BAP + 0,2 mg/l de AIA.
- *Tratamiento 3:* Medio M&S al 50% + 0,2 mg/l de 6-BAP + 0,2 mg/l de AIA.

Los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.8.

Variables establecidas

- Volumen de medio RITA: 150 ml.
- Densidad de siembra: 30 explantes.

⁴ En cada ensayo de la etapa de multiplicación y de enraizamiento se establecieron dos repeticiones por tratamiento (cada RITA equivalió a una repetición).

- Frecuencia de inmersión: 3 veces al día (cada 8 horas).
- Duración de la inmersión: 1 minuto.

Ensayo II

- *Tratamiento 1:* Medio M&S al 100% + 0,2 mg/l de 6-BAP + 0,2 mg/l de AIA.
- *Tratamiento 2:* Medio M&S al 75% + 0,2 mg/l de 6-BAP + 0,2 mg/l de AIA.

Variables establecidas

- Volumen de medio RITA: 200 ml.
- Densidad de siembra: 30 explantes.
- Frecuencia de inmersión: 3 veces al día (cada 8 horas).
- Duración de la inmersión: 2 minutos.

Los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.8.

Etapa de enraizamiento⁵

Para esta etapa se realizó un ensayo con dos tratamientos.

- *Tratamiento 1:* Medio WPM al 100% + 10 mg/L myo-inositol + 30 g/L de sacarosa + 0,1 mg/L de AIB (medio utilizado por la empresa).
- *Tratamiento 2:* Medio WPM al 75% + 10 mg/L myo-inositol + 30 g/L de sacarosa + 0,25 mg/L de AIB (medio modificado).

Variables establecidas

- Volumen de medio RITA: 200 ml.
- Densidad de siembra: 30 explantes.
- Frecuencia de inmersión: 3 veces por día (cada 8 horas).
- Duración de la inmersión: 2 minutos.

Análisis estadístico de los resultados

Para analizar los resultados obtenidos entre los tratamientos (rendimiento promedio), se realizó una prueba de hipótesis para la comparación de dos medias.

Resultados

Instalación del equipo y evaluación de las condiciones de asepsia

Se determinó que los dispositivos empleados para suministrar aire al interior de los RITA se adaptaron correctamente al sistema de inmersión temporal, lo que sugiere que este sistema es una alternativa a la utilización de equipo costoso.

La desinfección previa de los componentes del RITA disminuyó la posibilidad de contaminación del material durante las etapas de micropropagación y enraizamiento.

Etapa de micropropagación

Ensayo I

Como se observa en el Cuadro 1, el peso fresco promedio de los brotes cultivados en los tratamientos T1 y T2 (M&S al 100%, M&S al 75%) fueron similares. Sin embargo, con respecto al rendimiento promedio, el análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa (Z teórica, 95%=1,645; Z calculada=1,718) entre los tratamientos T1 y T2.

Cuadro 1
Efecto de la concentración del medio M&S y reguladores del crecimiento en la micropropagación de *Bergenia spp* var. *Herbstblüte*.

Tratamiento	Peso fresco promedio (g) /planta	Rendimiento promedio/explante
T1 (M&S al 100%)	0,23	3,1
T2 (M&S al 75%)	0,22	3,6
T3 (M&S al 50%)	0,15	2,4

Fuente: Innovaplant de Costa Rica S.A.

⁵ Se establecieron dos repeticiones por tratamiento (cada RITA equivalió a una repetición).

Los valores más bajos en relación al peso y al rendimiento promedio se observan en el T3 (M&S al 50%) con un 0,15 y un 2,4 respectivamente.

En la figura 2 se muestra el efecto de los tratamientos evaluados en la micropropagación de *Bergenia* spp var. Herbstblüte después de 4 semanas de cultivo.

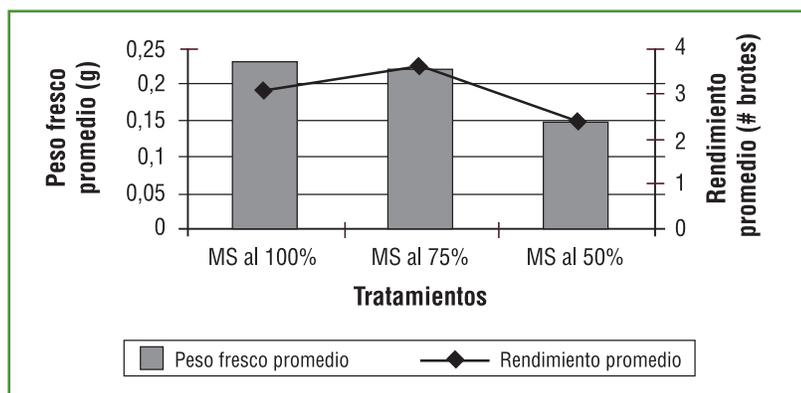


Figura 2
Resultados obtenidos en la etapa de multiplicación a partir de tres concentraciones del medio M&S.



Figura 3
Plántulas de *Bergenia* spp var. Herbstblüte, micropropagadas en medio M&S al 100%.

Apariencia del material vegetal

Al concluir el período de multiplicación y evaluar el material, se observó una diferencia en el crecimiento y desarrollo de las plántulas en relación al tratamiento (Fig. 3). Se determinó que el volumen de medio de cultivo (150 ml) en los RITA resultó ser insuficiente para completar el período de multiplicación.

Debido a que los resultados obtenidos en el T3 fueron bajos en comparación con T1 y T2, se decidió eliminarlo en el siguiente ensayo.

Ensayo II

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en el Cuadro 2.

Apariencia del material vegetal

El material vegetal fue evaluado y se determinó que en el T1 (M&S al 100%) las vitropantallas presentaron un buen desarrollo; algunas con crecimiento tipo macolla y otras con brotes individualizados, condición favorable en la micropropagación (Fig. 5).

En el T2 (M&S al 75%) el material mostró brotes mas pequeños pero más individualizados en comparación con el T1 (M&S al 100%) (Fig. 5).

Estadísticamente no hubo diferencia significativa entre tratamientos (Zteórica,95%=Zcalculada). Esto supone que una reducción del 25% no tiene repercusiones negativas en el desarrollo de las plantas.

Etapa de enraizamiento

En esta etapa se evaluaron dos medios de cultivo, el medio WPM utilizado por la empresa Innovaplant y un medio WPM modificado.

El Cuadro 3 presenta los datos correspondientes al peso fresco promedio de las plántulas enraizadas obtenidos a partir de los tratamientos. En ambos casos se observó proliferación

Cuadro 2
Efecto de la concentración del medio M&S y reguladores del crecimiento en la micropropagación de *Bergenia spp* var. *Herbstblüte*.

Tratamiento	Peso fresco promedio (g) /planta	Rendimiento promedio/explante
T1 (M&S al 100%)	0,46	4,0
T2 (M&S al 75%)	0,44	3,9

Fuente: Innovaplant de Costa Rica S.A.

Cuadro 3
Efecto de dos tratamientos en la etapa de enraizamiento de *Bergenia spp* var. *Herbstblüte*.

Tratamiento	Peso fresco promedio (g) /planta
T1 WPM (empresa)	0,25
T2 WPM (modificado)	0,27

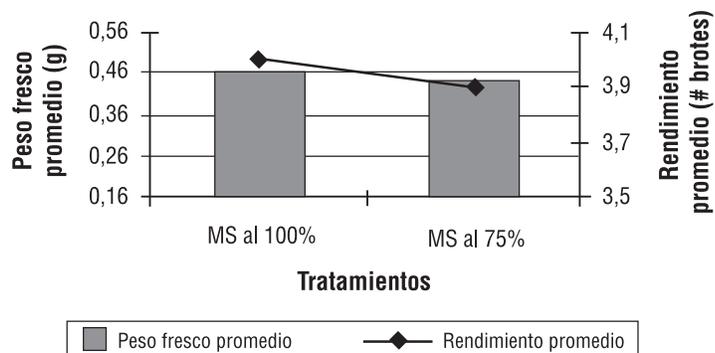


Figura 4
Resultados obtenidos en la etapa de multiplicación a partir de dos concentraciones del medio M&S.

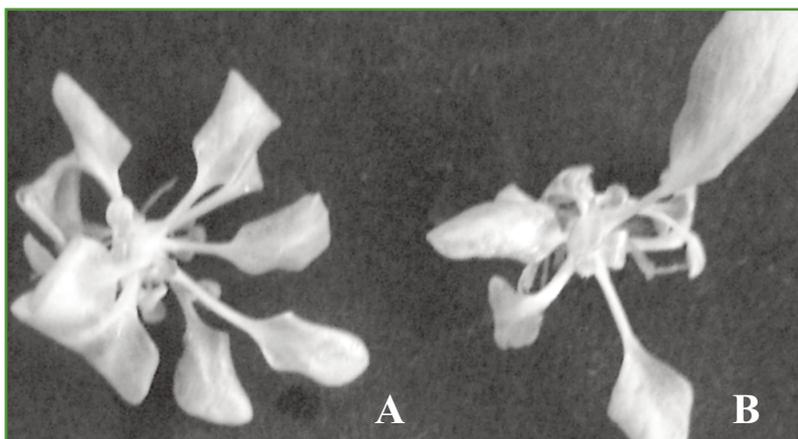


Figura 5
Plántulas de *Bergenia spp* var. *Herbstblüte*, micropropagadas en medio M&S al 100% (A) y al 75% (B).

de raíces; sin embargo, en el medio modificado la densidad fue mayor.

Apariencia del material vegetal

Se determinó que el desarrollo óptimo del sistema radical en el material se logra después de 11 días de cultivo, lo que redujo significativamente el período de enraizamiento de *Bergenia spp* var. *Herbstblüte* si se compara con el enraizamiento en medio semisólido, que tarda entre 23 a 25 días.

En el medio WPM (utilizado por la empresa) la longitud promedio de las raíces fue de 3 cm y el número de raíces por planta fue de 6 a 9 (Fig. 6A).

Sin embargo, en el medio WPM modificado, se observó una mayor densidad de las raíces (10 a 12), con una longitud promedio de 4 cm (Fig. 6B).

Discusión

La implementación del sistema de inmersión temporal (RITA) en la micropropagación de *Bergenia spp* var. *Herbstblüte*, contribuyó a reducir las etapas de multiplicación y de enraizamiento del material vegetal, tal como fue demostrado previamente para otras especies por Levin *et al.* (1988), Hammerschlag (1982); Harris y Mason (1983).

El empleo del sistema de inmersión temporal simplifica las actividades; así,

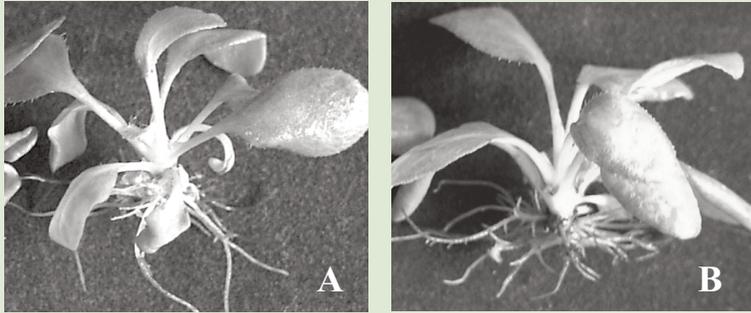


Figura 6
Plántulas de *Bergenia* spp var. Herbstblüte, enraizadas en: A)
Medio WPM (empresa), B) Medio WPM (modificado).

por ejemplo, se redujo el tiempo de siembra y se observó una disminución en los requerimientos de espacio en los estantes del área de crecimiento.

Teisson *et al.* (1996) señalan que en el diseño del RITA se prestó especial atención a su fácil manipulación y poco riesgo de contaminación.

En la figura 4 se muestra el efecto de los tratamientos en la micropropagación de *Bergenia* spp var. Herbstblüte después de 4 semanas de cultivo.

Aitken-Christie (1991) y Scragg (1992), señalan que el establecimiento de esta técnica implica un costo inicial elevado. Sin embargo, en este estudio se redujeron los costos utilizando dispositivos empleados en acuarios. Este equipo fue adaptado al sistema como alternativa a la utilización de componentes más sofisticados y costosos.

Para establecer el sistema, se llevaron a cabo varios ensayos, con el fin de definir las variables que se requerían para su óptimo desempeño. A partir de estas pruebas, se determinó que la cantidad de medio adecuado que se debía agregar al RITA era de 200 ml para las dos etapas (micropropagación y enraizamiento), ya que volúmenes inferiores no permitieron sumergir completamente las plántulas en la

tercera y cuarta semana de cultivo, situación que provocó el deterioro del material. Flores *et al.* (1998) en pruebas realizadas en otras especies consideraron que volúmenes superiores a 200 ml no eran necesarios.

Se demostró que la especie estudiada, puede ser multiplicada exitosamente después de cuatro semanas de cultivo en medio líquido sin la evidencia de vitrificación; esto, debido a la baja frecuencia y la poca duración del período de inmersión al que fue sometido el material en los diferentes ensayos. Chu *et al.* (1993) determinaron que una de las causas que produce vitrificación es la exposición de los explantes a largos períodos de inmersión en grandes volúmenes de medio.

La duración de la inmersión es probablemente uno de los factores de mayor atención en el diseño de sistemas de cultivo en medio líquido para especies propagadas *in vitro* (Alvard y Teisson, 1993). En ensayos preliminares que se realizaron para ajustar las variables en la etapa de multiplicación, se observó que inmersiones de un minuto eran insuficientes para renovar y oxigenar la atmósfera interna de los recipientes, ya que la exposición total de los explantes al medio se logró después de 15 segundos de activado el motor. Para los ensayos siguientes se definió el período de inmersión en dos minutos, con el fin de favorecer las condiciones de oxigenación.

Con respecto a la frecuencia de inmersión, se determinó que la exposición del material vegetal al medio de cultivo cada 8 horas fue la apropiada, con la ventaja de que una fina película de medio permanecía sobre la superficie de los explantes durante el período de reposo.

Algunas investigaciones indican que la disponibilidad de las citocininas, agua y sales minerales es diferente en medio

semisólido vs medio líquido (Debergh y Maene, 1981). Debergh (1983) encontró que con el incremento en la concentración de agar (8-15 g/L), la habilidad de los tejidos vegetales para absorber la cinetina disminuye. Posiblemente el aumento en la brotación de *Bergenia* spp var. Herbstblüte en este estudio, se debió a una mayor disponibilidad de los componentes en medio líquido. Por esta razón se debe tener presente la posibilidad de reducir la concentración de los constituyentes del medio, con el fin de evitar una posible intoxicación de los tejidos por sobredosificación.

Para *Bergenia* spp var. Herbstblüte la reducción del medio M&S al 75% produjo un material con una calidad similar al obtenido en un medio M&S al 100%; en ambos casos se observó buena coloración y un rendimiento promedio de 3,9 brotes por plántula.

Se debe señalar también que la inmersión temporal favorece el desarrollo en elongación y área foliar (biomasa) de la mayoría de las especies cultivadas bajo este sistema (Teisson *et al.*, 1996).

En la etapa de enraizamiento se redujo a la mitad el tiempo necesario para inducir la proliferación adecuada de raíces, pasando de 23 días en medio semisólido, a 11 días en medio líquido (RITA). Esto se debe a una mayor disponibilidad de sales minerales y otros componentes en el medio, como ha sido mencionado por Debergh y Maene (1981). El tratamiento WPM modificado indujo la mejor respuesta del material vegetal; debido al aumento en la concentración de ácido indol butírico y a la reducción de la concentración del medio de cultivo, se observó una mayor proliferación de raíces por plántula.

Referencias

- Aitken-Christie, J. 1991. Automation. In: Debergh, P.C; Zimmerman, R.H, eds. Micropropagation technology and application., Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 363-388.
- Alvard, F; Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation, effects of temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 55-60.
- Chu, C; Knight, S; Smith, M. 1993. Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. "Minima"). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 329-334.
- Debergh, P. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant*. 59: 270-276.
- Debergh, P; Maene, L. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort*. 14: 335-345.
- Flores, D; Gómez, L; Navarro, R; Rivera, C. 1998. Producción de semilla de papa de alta calidad. Informe final. CONICIT-MICIT. 27 p.
- Hammerschlag, F. 1982. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. *HortScience*. 17: 85-86.
- Harris, R; Mason, E. 1983. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Can. J. Plant Sci*. 63: 311-316.
- Levin, R; Gaba, V; Tal, B. 1988. Automated plant tissue culture for mass propagation. *Biotechnology* 6: 1025-1040.
- Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-497.
- Preil, W; Florek, P; Wix, U. 1988. Towards mass propagation by use of bioreactors. *Acta Hort* 226: 99-105.
- Scragg, A. 1992. Large-scale plant cell culture: methods, applications and products. *Biotechnol*. 3: 105-109.
- Teisson, C; Alvard, B; Berthouly, F; Cote, J; Escalant, H. and Lartaud, M. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. In: International symposium on plant production in closed ecosystems. *Acta Horticulture*. No 440, 521-526.