

Propagación acelerada de plantas ornamentales por métodos de cultivo de tejido

JOSÉ DEL SOL OLIVA, MARISOL TORRES GONZÁLEZ y JULIA PEDROSO SUÁREZ

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Apartado 6880, Cubanacán, Playa
La Habana, Cuba

Recibido el 7 de diciembre de 1984

RESUMEN

Se estudian los aspectos más importantes para la propagación acelerada de *Saint poulia* (violeta africana), *Sphatoglottis* (orquídea terrestre) y *Gerbers* (margarita) por cultivo de tejido y el pasaje de las plantas obtenidas *in vitro* a tierra. Se estudiaron las condiciones de cultivo, evitando el encarecimiento del proceso. Se analiza la velocidad de propagación por este método respecto al convencional, y se ilustra su factibilidad económica.

SUMMARY

Most important aspects about plants propagation of *Saint poulia* (violet), *Sphatoglottis* (orchid) and *Gerbers* (marguerite) by the use of tissue culture methods are discussed. Plants, obtained *in vitro*, were transferred to soil and grew in greenhouses. Cultural conditions were studied, trying to avoid the use of expensive medium. Comparative velocity of this propagation process respect the conventional one is analyzed and economical factibility of it is shown.

INTRODUCCION

Si mucho se ha hablado, con razón, en el marco de la palabra biotecnología, de las múltiples posibilidades del cultivo de tejido en plantas superiores (Street, H. E., 1977), también es cierto que la propagación de plantas, tal vez uno de los acápites más simples de estos métodos es la que mayor aplicabilidad ha tenido, con el desarrollo de grandes laboratorios en varios países (Holdgate, D. P., 1977).

Aunque frecuentemente la propagación de las plantas necesarias para el hombre se garantiza por la vía convencional, estos métodos en los que en muchos casos la velocidad de propagación es miles de veces superior, ayudan en la introducción de nuevas variedades y en la propagación de plantas de lenta propagación sexual o vegetativa, como por ejemplo orquídeas (Rao, A. N., 1977), árboles maderables (Bohga, J. M., 1980), etcétera. En particular, en el caso de plantas

ornamentales, además de cumplirse en muchas de ellas lo anterior, las fluctuaciones de las demandas del mercado hacen de estos métodos una gran herramienta. De hecho, los laboratorios más importantes abordan fundamentalmente la propagación de estas plantas junto a las plantas maderables y frutales (Skirium, R. M., 1981).

Las condiciones de asepsia, nutrición y humedad que propicia el cultivo, garantizan la propagación vegetativa (por yemas de crecimiento) de muchas plantas que no lo logran en tierra, incluso sin empleo de hormonas en el medio de cultivo. Por otra parte, al emplear hormonas, muchas veces se induce la formación de plantas u órganos a partir de células o tejidos, de forma que se garantiza una propagación rápida y continua de estas. La capacidad de producir órganos a partir de tejidos es una propiedad característica de las plantas. El mecanismo fisiológico de este fenómeno es aún poco conocido (Dodds, J. H. y L. W. Roberts, 1982).

Las plantas obtenidas resultan libres de gérmenes patógenos, e incluso es posible eliminar virus endémicos por estos métodos (Rao, A. N., 1977). Por otra parte, la tendencia es a la uniformidad del fenotipo con propensión al rejuvenecimiento o reorganización de las variedades y con pocos cambios genéticos, que de ocurrir, pueden aprovecharse, en particular, en plantas ornamentales.

En este trabajo se presentan las condiciones óptimas de propagación de violetas, una especie de orquídeas, y margaritas, y se discute en relación con la velocidad, estabilidad y factibilidad de aplicación del sistema.

MATERIALES Y METODOS

Origen del material estéril

Sphatoglottis (orquídea terrestre): Las vainas maduras fueron esterilizadas externamente con hipoclorito de sodio comercial diluido en agua (1:2), durante 30 minutos y se lavaron cuatro veces con agua estéril. Las semillas se distribuyeron en medio MS (ver los medios en la tabla 1), y medio MSI en erlenmeyers de 250 ml (todas las operaciones, en un equipo de flujo de aire estéril). Los frascos se colocaron en el cuarto de luces con 10 horas diarias de iluminación a 3 000 lux y 25°C.

Saint poulia (violeta) y *Gerberas* (margarita) fueron suministradas gentilmente (un frasco de cada variedad) por laboratorios de Hungría (Rozmaring, Budapest), República Dominicana (empresa privada) y Checoslovaquia (Havirro), para su propagación en nuestras condiciones.

Condiciones de propagación

Sphatoglottis: Las semillas germinadas fueron transferidas a frascos con medios MS, MS-coco, MSI y MS con carbón activado 1 g/l (tabla 1). Se colocaron a 5 000 lux hasta su desarrollo vegetativo. Las plantas resultantes fueron pasadas a tierra o empleadas para la inducción de ahijamiento o protocormos.

Para ello, plantas de 3 a 6 cm se despojaron de hojas y raíces y se colocaron en medio MS-coco, MSP y MSK. Los frascos se colocaron a la luz de 5 000 lux en el cuarto de luces para continuar su propagación por esta vía.

Las plantas de 6-8 cm con buen sistema radicular fueron lavadas, tratadas con fungicida y sembradas en tierra, turba y mezclas fibrosas, así como una mezcla de fibras-turba y humus (2:1:0,5).

Tabla 1
MEDIOS DE CULTIVO

Compuesto	Concentración en mg/l				
	MS	MS-coco	MSI	MSP	MSK
NH ₄ NO ₃	1 650	1 650	1 650	1 650	1 650
KNO ₃	1 900	1 900	1 900	1 900	1 900
CaCl ₂ ·6H ₂ O	655	655	655	655	655
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
EDTA	37	37	37	37	37
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
KI	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
Azúcar de caña	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Meso-inositol	100	100	100	100	100
Glicina	2 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³
Piridoxina	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴
Tiamina	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴
Acido nicotínico	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴
Agua de coco	—	10% v/v	—	—	—
Kinetina	—	—	—	—	2
Benziladenina	—	—	0,2	5	—
Acido indolacético	—	—	5	0,2	—
Agar No. 3	8 000	8 000	8 000	8 000	8 000
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Saint poulia: Inicialmente plántulas pequeñas, hojas y tallos fueron distribuidos sobre medio-agar MSK (empleado en Hungría). Al disponer de un número suficiente de frascos, las plantas fueron transferidas a un medio MS, MS-coco, MSP y MSK para estudiar las condiciones de cultivo a intensidades de luces de 3 000 y 5 000 lux en el cuarto de luces.

En las condiciones óptimas, se desarrolló la propagación masiva. Para ello, las mayores plantas (2,5-3,5 cm) de un frasco fueron pasadas a tierra, mientras las medianas (sin raíces) se pasaban a medio frasco y las más pequeñas se eliminaban del proceso (fig. 2). Para sembrar las plantas se eliminó el agar de las raíces con agua y se sembraron en distintas mezclas de tierra. Las plantas se pasaron a una casa de cristal con control de hongos y nemátodos, evitando la luz directa del sol (fig. 3).

Gerberas: Estas requieren dos pasos: la formación de hijos laterales sin raíces y la separación y enraizamiento de estos. Para evaluar el ahijamiento, plantas sin raíces fueron sembradas en



FIG. 1. Frascos que contienen cientos de violetas durante el proceso de propagación masiva.

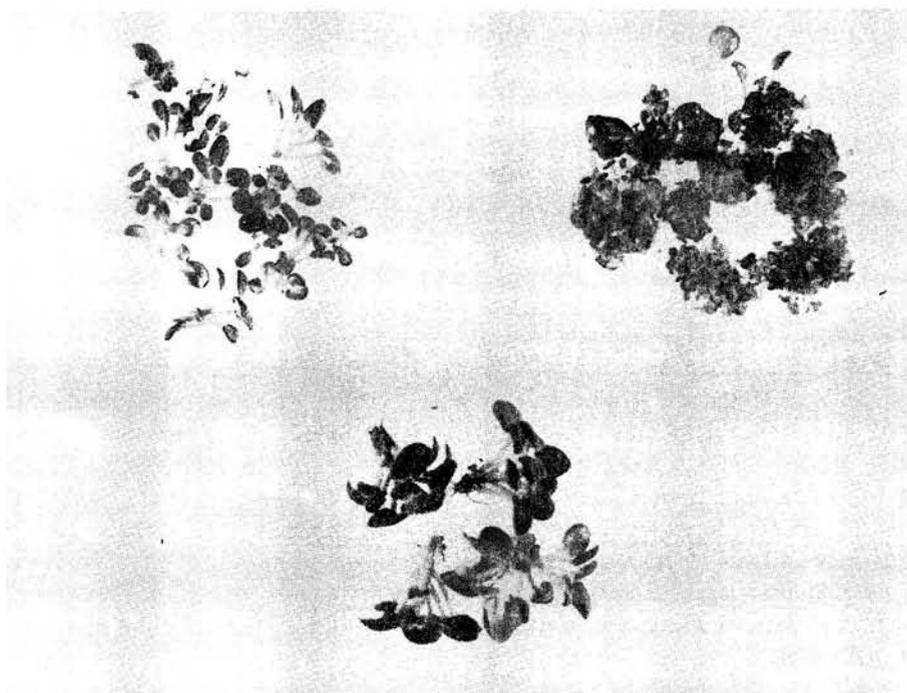


FIG. 2. Violetas. Para pasar a tierra (arriba); para eliminar (abajo-izquierda); para propagar (abajo-derecha).



FIG. 3. Plantas de violeta en tierra.

medios MS-coco, MSK, MSP y MSP con la concentración de hormonas duplicadas (recomendado en Checoslovaquia). Los frascos fueron colocados en el cuarto de luces a intensidades de 3 000 y 5 000 lux. Para enraizar, plántulas de 1 a 3 cm fueron sembradas en medios MS, MS-coco, MSI y MSI con la concentración de hormona duplicada (usado en Checoslovaquia). Los frascos fueron colocados a 5 000 lux de intensidad lumínica. Plantas con raíces fueron lavadas y pasadas a tierra.

RESULTADOS Y DISCUSION

Sphatoglottis: El 50 por ciento de los frascos con semillas se contaminó; en el resto, el 100 por ciento de las semillas germinó después de 45 días, observándose mayor desarrollo de las plántulas en medio MSI (tabla 2); a los 3 meses las plantas fueron pasadas a otros medios para su desarrollo vegetativo. En este sentido, el medio MS con carbón activado fue muy superior al resto donde las plantas crecen más lento (MS y MS-coco) o desarrollan demasiado su sistema radicular (MSI). Las plantas pueden pasarse a tierra después de tres a cuatro meses. Sólo la mezcla de turba-helecho arborescente-humus fue adecuada, con más de 70 por ciento de recobrado de plantas.

Si bien la propagación por semillas estériles en este caso aumenta miles de veces los rendimientos respecto a otros métodos, su empleo requiere un suministro estable de semillas. Sin embargo, la formación de protocormos (única vía en muchas orquídeas), garantiza una propagación continua y más homogénea de plantas. De los medios ensayados para el desarrollo de protocormos, el medio MSP propició la formación de decenas de hijos por cada planta sembrada.

Tabla 2
MEDIOS APROPIADOS PARA CADA ESPECIE

<i>Especie</i>	<i>Medios</i>
<i>Spathoglottis</i> (orquídea)	Germinación: MSI Crecimiento: MS + carbón Protocormos: MSP
<i>Saint poulia</i> (violeta)	Iniciación: MSK Propagación: MSK y MS-coco
<i>Gerbera</i> (margarita)	Ahijamiento: MSP Enraizamiento: MS-coco y MSI

Por otra parte, los medios MS-coco y MSK sólo propiciaron el desarrollo vegetativo. Esta vía de propagación puede asegurar la formación de decenas de miles de plantas en un año, las que deben enraizarse para su pasaje a tierra. No se observaron las fenalizaciones típicas de orquídeas en esta especie.

Saint poulia: Si bien el medio reportado (MSK) provoca una elevada proliferación de plantas por efecto de la kinetina, en el medio MS-coco la proporción de plantas óptimas para pasar a tierra y la vigorosidad fue mayor, sin que varíe notablemente el rendimiento de biomasa.

Por estas razones y su menor costo, este medio fue empleado para la propagación (fig. 1). El medio MS resultó inferior al resto y en el medio MSP no sólo detuvo el crecimiento, sino que propició el envejecimiento y la muerte celular. Aunque esta ha sido la situación en la variedad estudiada, ambos medios (MS-coco y MSK) deben ensayarse inicialmente al estudiar otras variedades por la mayor universalidad del medio MSK (tabla 2). Cada 45 días, en medio MS-coco, 15-20 plantas por frasco fueron pasadas a tierra y seis nuevos frascos iniciados con las plantas más pequeñas. Esto permite que después de un año puedan producirse hasta un millón de plantas; de hecho, en nuestras capacidades hemos pasado a tierra más de 6 000 plantas y podemos producir de 2 000 a 4 000 plantas mensuales. La viabilidad de las plantas en tierra es superior a 95 por ciento y crecen hasta florecer en una mezcla de tierra-turba-carbón de 3:1:0,5. Estos datos muestran velocidades de propagación miles de veces superiores al método convencional y el costo de cada planta varía de 1 a 1,5 pesos (incluyendo la maceta de venta), lo que la hace rentable.

En las plantas en tierra no se observan diferencias morfológicas o fenotípicas.

Gerberas: Como en los casos anteriores, el número de plantas producidas es muy elevado. La fase de ahijamiento mostró el medio MSP superior al resto, incluyendo el medio reportado para estas variedades; la kinetina y el agua de coco no producen plantas laterales a las concentraciones ensayadas. Se requiere el empleo de alta intensidad de luz (5 000 lux).

Por cada planta sembrada, después de 4-6 semanas se obtienen plantones de 12 a 20 plantas sin raíces. La fase de enraizamiento tiene lugar en todos los medios empleados, sin embargo, el medio MS-coco fue superior al MSI que se ha empleado para estos objetivos en Checoslovaquia. Después de 30 días se obtienen plantas que crecen bien en las mismas condiciones que las violetas.

Los resultados en estas tres plantas ornamentales evidencian la factibilidad y lo promisorio del desarrollo de estos métodos en países tropicales.

REFERENCIAS

- BOHGA, J. M. (1980). *Plant Propagation Through Tissue Culture, Emphasizing Woody Species*. En: *Plant Cell Cultures: Results and Perspectives*. Ed. F. Sala, B. Parisi y R. Cella. Elsevier North Holland Biomedical Press Amsterdam, pp. 253-265.
- DODDS, J. H. y L. W. ROBERTS (1982). *Organogenesis*. En: *Experiments in Plant Tissue Culture*. Ed. J. H. Dodds y L. W. Roberts. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 78-89.
- HOLDGATE, D. P. (1977). *Propagation of Ornamentals by Tissue Culture*. En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Ed. J. Reinert and Y. P. S. Bajaj. Springe-Verlag-Berlín, pp. 18-42.
- RAO, A. N. (1977). *Tissue Culture in the Orchid Industry*. En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Ed. J. Reinert y Y. P. S. Bajaj. Springe-Verlag-Berlín, pp. 44-65.
- SKIRIUN, R. M. (1981). *Fruit Crops*. En: *Cloning Agricultural Plants via in vitro Techniques*. Ed. B. V. Congress. CRC Press. Inc. Florida, pp. 51-141.
- STREET, H. E. (1977). *Old Problems and New Perspectives*. En: *Plant Tissue and Cell Culture*. Ed. H. E. Street. University of California Press, pp. 501-512.