

COMBINACIÓN DE TÉCNICAS *IN VITRO* Y *EX VITRO* PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE SANTA RITA (HIBR.) UNA ARBUSTIVA DE RELEVANCIA ORNAMENTAL

*ESCANDÓN, A.S.^{1,2}; FERRARI, P.¹; FACCIUTO, G.^{1,2}; SOTO, S.¹; HAGIWARA, J.C.¹; ACEVEDO, A.²

RESUMEN

Se ha desarrollado un protocolo para la multiplicación de Santa Rita (*Bougainvillea sp*) que combina técnicas *in vitro* y *ex vitro*. Los explantos, segmentos nodales, fueron esterilizados por inmersión en solución de lavandina comercial (5 %) y Tween 80 (0,1 %) por 20 minutos. Una vez enjuagados se mantuvieron en solución de Plant Preservative Mixture (2 %), en agitación suave, durante 7 horas. Con el objeto de evaluar la aptitud para la multiplicación se probaron dos tipos de explantos: inducidos (por eliminación del ápice 15 días antes del inicio del ensayo) y no inducidos. Los mejores resultados se obtuvieron con el medio Murashige-Skoog, suplementado con 5,0 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), 0,01 mg/l de ácido giberélico (AG_{III}), 20 g/l de sacarosa y mezcla de antibióticos y

¹Centro de Estudios Técnicos en Flori, Fruti y Horticultura, CETEFFHO, INTA

²Instituto de Recursos Biológicos, CRN-INTA.

Título abreviado: Micropropagación de Santa Rita

*Autor para correspondencia

Centro de Estudios Técnicos en Flori, Fruti y Horticultura, CETEFFHO, INTA, Nicolás Repetto y De los Reseros s/n, B1712WAA Castelar, Buenos Aires, Argentina. Fax y teléfono :+54 11 4621-7495
Email: aescandon@cnia.inta.gov.ar

antimicóticos de Sigma (1X), el pH se ajustó a 5,7. Los subcultivos se realizaron sobre el mismo medio, con concentraciones decrecientes de BAP. Con estas condiciones de cultivo, en los explantos inducidos se observó una tasa de multiplicación de 2,5:1, mientras que para los no inducidos la tasa fue 1:1. Los brotes fueron enraizados en forma directa en multimacetas bajo condiciones de alta humedad relativa y, una vez enraizados, fueron transferidos a macetas para la etapa de aclimatación. Los porcentajes de enraizamiento y aclimatación fueron 60 % y 100 %, respectivamente.

Palabras clave: *Nyctaginaceae; Bougainvillea; micropropagación; cultivo in vitro de tejidos vegetales.*

ABSTRACT

COMBINATION OF *IN VITRO* AND *EX VITRO* TECHNIQUES TO MICROPROPAGATE *BOUGAINVILLEA*. A SHRUBBY PLANT WITH ORNAMENTAL RELEVANCE

A protocol combining *in vitro* and *ex vitro* techniques was developed to propagate *Bougainvillea sp.* To sterilize explants, nodal segments were submerged in commercial sodium hypochlorite (5 %) and Tween 80 (0.1 %) for 20 minutes. Subsequently, they were maintained in Plant Preservative Mixture (2 %) under constant and gentle shaking for 7 hours. Induced and non-induced explants were tested to compare their shoot multiplication rates. The best result was obtained when Murashige-Skoog (MS) basal medium was supplemented with: 5 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP), 0.01 mg/l giberellic acid (III), 20 g/l sucrose and a mixture of antibiotics/antimicrobics (1x), pH 5.7, as induction medium. Induced and non-induced explants were subsequently transferred to MS basal medium supplemented with constant levels of giberellic acid (III) and decreasing concentration of BAP. Under these culture conditions, induced explants produced 2.5 times more shoots than non-induced ones. Plantlets were rooted cutting the *in vitro* shoots and inserting them in plugs under high humidity conditions. Whole plants were recovered 30 to 45 days later and transferred to pots for the acclimatization stage. While rooting percentage was 60 %, rustication percentage was 100 %.

Keywords: *Nyctaginaceae; paper flower; micropropagation; tissue culture.*

INTRODUCCIÓN

Bougainvillea sp (Santa Rita) es un género perteneciente a la familia *Nyctaginaceae*, originario de América del Sur y distribuido en las regiones tropicales y subtropicales. Su profuso follaje, sus vistosas flores y la posibilidad de poder adaptarlo como planta de maceta o como arbusto, le otorgan un considerable valor como planta ornamental.

Por el efecto de la temperatura y el fotoperíodo, en regiones próximas al Ecuador, Santa Rita florece durante todo el año. En la Argentina Santa Rita florece desde mediados de primavera hasta mediados del verano, observándose diferencias entre las distintas variedades comerciales. Las variedades comerciales locales no producen semilla, lo que representa una barrera natural que impide el cruzamiento entre las variedades de interés.

Si bien se desconocen las causas genéticas o fisiológicas que provocan este tipo de esterilidad, la poliploidización *in vitro* (Notsuka *et al.*, 2000) aparecería como una alternativa válida para superar este problema y obtener plantas fértiles que permitan iniciar un programa de mejoramiento.

La multiplicación agámica de las plantas mejoradas o selectas permite mantener las características seleccionadas del genotipo. Aun cuando la propagación vegetativa, a través de estacas, ha sido la forma de multiplicación tradicional de esta especie, (<http://bougainvillea.freeyellow.com>), este método tiene una baja tasa de multiplicación y no permite la realización de tratamientos controlados con agentes poliploidizantes. La información disponible sobre la multiplicación *in vitro* de Santa Rita es limitada (Sharma & Dhir, 1985; Steffen *et al.*, 1988a; 1988b; Javed *et al.*, 1996). Debido a ello, es altamente deseable disponer de un método para multiplicarla bajo condiciones controladas, a gran escala. El mismo permitirá la obtención de plántulas que podrán ser utilizadas en futuros experimentos de poliploidización *in vitro* (Zadoo *et al.*, 1975).

En este trabajo se presenta el desarrollo de un protocolo de multiplicación *in vitro*, de fácil aplicación, para Santa Rita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon plantas de *Bougainvillea sp*. Estas se mantienen en el suelo, en los invernáculos del CETEFFHO. Los ensayos se realiza-

ron en primavera temprana. Como explantos se utilizaron segmentos nodales de 1,0 cm, en dos estados fisiológicos diferentes, inducidos y sin inducir. En el primer caso se removió la yema apical 15 días antes del comienzo del ensayo y se utilizaron hasta 4 nudos por tallo.

Desinfección de los explantos

Para la desinfección de los segmentos nodales, el método estándar de etanol (70°, 30'')/lavandina (5, 10 y 25 %, 20') se combinó con pretratamiento con Captan® o Preservative Mixture® (PPM) al 2 % y/o el agregado al medio de cultivo de PPM (2ml/l) y/o la mezcla de antibióticos y antimicóticos de Sigma (AAS) al 1 %. La Tabla 1 muestra las distintas combinaciones y/o condiciones empleadas para la desinfección de los explantos. Los explantos tratados con PPM (Tratamientos 6 a 9) se cultivaron en la oscuridad durante la primera semana. El AAS fue agregado al medio de cultivo en forma estéril. El efecto de los diferentes tratamientos de desinfección fue evaluado a los 20 y a los 40 días de iniciado el ensayo.

Condiciones de cultivo

Los explantos se cultivaron en el medio Murashige-Skoog (MS) (1962), el que fue suplementado con 20 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar y diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG_{III}) (Tabla 2). El pH se ajustó a 5,7 con KOH. Las condiciones de cultivo fueron de 23±2 °C con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad lumínica de 3.000 lux. El número de explantos por tratamiento fue 30 y los subcultivos se efectuaron una vez por mes.

Los callos formados con los tratamientos M0 a M5 se subcultivaron en un medio libre de hormonas.

La concentración inicial de BAP usada en el tratamiento M6 (5,0 mg/l), se disminuyó gradualmente en subcultivos sucesivos (en mg/l: 5,0 2,0, 1,0, 0,5 y 0,0). La de AG_{III}, se mantuvo hasta que, luego de 4 subcultivos, los brotes se transfirieron a un medio libre de hormonas.

En la etapa de enraizamiento *in vitro* se probaron dos medios, el MS 1X y el MS 0,25X, ambos se suplementaron con 0,0 ó 5,0 mg/l de ácido α -naftalen acético (ANA) y 4 gr/l de agar (tratamientos R1 a R4), el número de explantos de cada tratamiento fue 20. Para el tratamiento R5, *ex vitro*, se utilizaron plugs, empleando Growing Mix 2® (Conrad Fafard, Inc, USA) como soporte artificial. En este tratamiento los brotes se man-

tuvieron en cámara de cría, con alta humedad relativa ambiental, hasta completar la etapa de formación de raíces.

Para la etapa de aclimatación, las plantas enraizadas se transfirieron a macetas de 8 cm de diámetro que contenían el mismo soporte artificial y se mantuvieron con alta humedad relativa. La bolsa de polietileno usada para la mantener la humedad fue cuidadosamente perforada diariamente hasta no observar condensación en su interior, momento a partir del cual las plantas fueron transferidas a invernáculo y cultivadas en condiciones naturales.

RESULTADOS

La desinfección y el establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales de Santa Rita mostraron un inesperado grado de dificultad. Al efecto de los contaminantes superficiales se sumó la presencia de contaminación endógena y una marcada sensibilidad de los tejidos vegetales a los agentes desinfectantes.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos de desinfección probados. El tratamiento 8 resultó ser el más

Tabla 1. Efecto de los diferentes tratamientos de desinfección aplicados a los segmentos nodales de Santa Rita. La sobrevivencia de los explantos indica ausencia de daño y contaminación.

Tratamiento	Etanol 70% 30 seg	% lavandina comercial. 20 min.	Tween 80 0,1%	Captan 4 g/l	PPM1*	AAS2*	PPM3*	Sobrevivencia de los explantos ⁴ día 20 día 40	
1	Si	5	Si	No	No	No	No	9,68	1,0
2	Si	10	Si	No	No	No	No	7,6	0,5
3	Si	25	Si	No	No	No	No	0,0	0,0
4	No	10	Si	No	No	No	No	0,91	0,0
5	No	10	Si	Si	No	No	No	9,1	0,0
6	No	5	Si	No	Si	No	No	8,14	8,14†
7	No	5	Si	No	Si	No	Si	11,61	11,61†
8	No	5	Si	No	Si	Si	No	6,72	6,72
9	No	5	Si	No	Si	Si	Si	7,12	7,12†

1) Los segmentos nodales fueron agitados por 7 h en solución de PPM al 2%.

2) Medio suplementado con AAS 1%.

3) Medio suplementado con 2ml/l de PPM.

4) Promedio de dos repeticiones (n=25 explantos por tratamiento).

* Los explantos fueron mantenidos en la oscuridad durante la primera semana de cultivo.

† Por oxidación o contaminación bacteriana, no se recuperaron brotes más allá del tercer subcultivo.

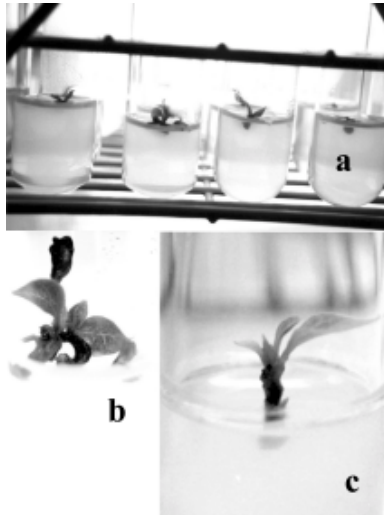


Figura 1. Diferentes aspectos del ensayo de desinfección. Panel **a**, la flecha muestra el crecimiento de la bacteria endógena en la base del brote. Panel **b**, muestra el amarronamiento y la vitrificación de las hojas observados en el tratamiento con PPM. Panel **c**, muestra la clorosis observadas en las hojas durante el tratamiento con AAS.

adecuado, ya que fue posible controlar la proliferación de hongos y se evitó la oxidación de las yemas laterales. Con el agregado de AAS no se detectó proliferación bacteriana más allá de los 40 días de cultivo y, si bien las hojas mostraron síntomas de amarillamiento, éstas recuperaron su color normal una vez subcultivadas a un medio libre de AAS.

En la etapa de multiplicación, el tratamiento M6 fue el único donde se desarrollaron yemas. Bajo estas condiciones de cultivo en el material inducido se obtuvieron hasta 3 brotes por explanto, mientras que en el no inducido sólo se pudo recuperar uno por explanto (Fig. 2 c, d). En el resto de los tratamientos se produjeron callos de color marrón, de aspecto esponjoso o nodular, de crecimiento muy vigoroso pero que no progresaron, ni diferenciaron yemas cuando fueron transferidos a un medio libre de hormonas (Fig. 2 a y b).

La Figura 3 muestra las distintas etapas del cultivo *in vitro* de Santa Rita. Los brotes adventicios formados

se desarrollaron desde la base de los principales, la tasa de multiplicación fue de 2,5, aunque en algunos casos se pudieron recuperar hasta 7 brotes (paneles b y c). En la Figura 3d se observa un brote en la fase final del cultivo *in vitro*.

A lo largo del proceso de cultivo se observaron cambios morfológicos muy notorios. En las primeras etapas del cultivo las hojas se caracterizaron por ser alargadas y sin pecíolo (Figs. 2b, c y 3b). En cambio, en la fase final de la etapa *in vitro* las hojas engrosaron, los pecíolos se hicieron evidentes y mostraron un fenotipo normal (Figs. 3c y 3d). En el invernáculo, las plantas *ex vitro* se desarrollaron y florecieron normalmente (Fig. 4c).

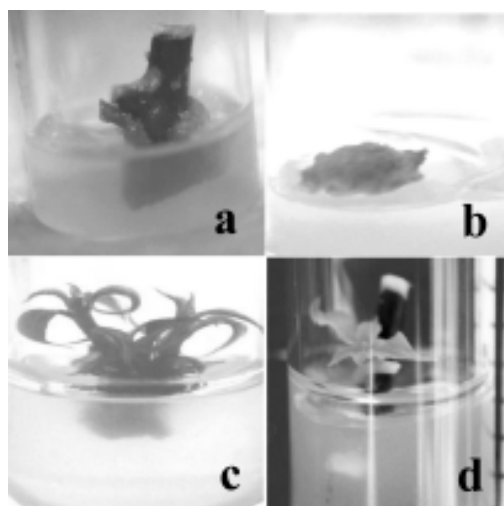
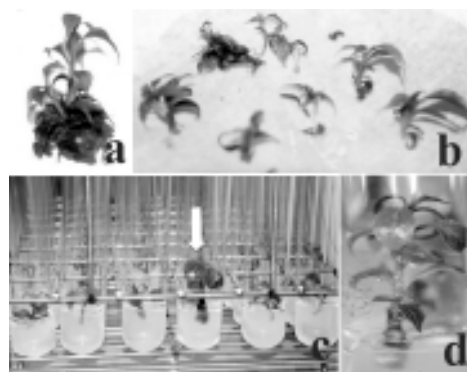


Figura 2. Respuesta de Santa Rita a las diferentes condiciones de cultivo. Explanto (Panel a) y callo (Panel b) creciendo en medio libre de hormona. Panel c: explantos pre inducidos. Panel d: no inducidos. En ambos casos el medio del cultivo fue M6.

Figura 3. Distintas etapas del cultivo de los explantos pre inducidos. Panel a: desarrollo de la yema principal y de los brotes adventicios. Panel b: brotes adventicios aislados del principal. Panel c: desarrollo alcanzado por los brotes al tiempo de su transferencia al medio libre de hormonas que precede a la de enraizamiento.



Los resultados obtenidos en los ensayos de enraizamiento se observan en la Tabla 3. Con una tasa de 0,6, la estrategia de enraizamiento *ex vitro* aplicada en el tratamiento R5 resultó la más adecuada.

La etapa de aclimatación no presentó inconvenientes, el total de las plantas enraizadas pudieron ser transferidas a condiciones de invernáculo. Las plantas *ex vitro* mostraron un desarrollo normal. La Figura 4 muestra la secuencia temporal de las etapas de enraizamiento y aclimatación de las plantas de Santa Rita.

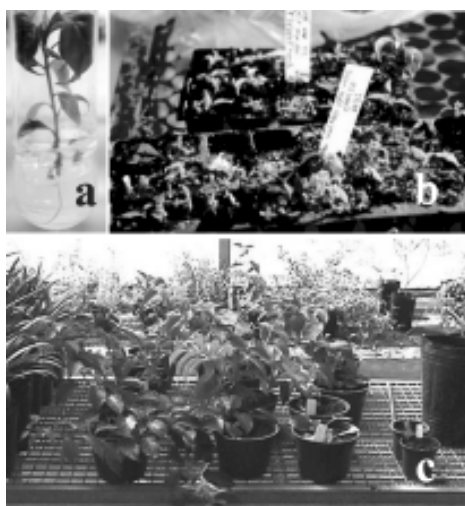


Figura 4. Etapa final del cultivo de Santa Rita. Panel a: brotes en etapa de enraizamiento bajo condiciones *in vitro*. Panel b: plántulas enraizando en Growing mix 2° (Tratamiento R5, Tabla 3). Panel c: plantas micropropagadas, enraizadas y aclimatadas floreciendo en el invernáculo.

Tabla 2. Diferentes combinaciones hormonales aplicadas en los ensayos de micropropagación de Santa Rita

Tratamiento	BAP (mg/l)	AG _{III} (mg/l)
M0	0	0
M1	0	0,01
M2	0,1	0
M3	0,1	0,01
M4	1,0	0
M5	1,0	0,01
M6	5,0	0,01

DISCUSIÓN

Las diferentes variedades comerciales de Santa Rita tradicionalmente se multiplican por enraizamiento de esquejes. Este sistema, si bien económico, sólo permite la recuperación de una planta por esqueje plantado (<http://bougainvillea.freeyellow.com>). Para superar esta desventaja se ha desarrollado un protocolo para la propagación de esta especie, en el cual se combinan las ventajas de la micropropagación (sanidad y tasa de multiplicación) con la capacidad de enraizamiento de la especie. Además, esta metodología permitiría el tratamiento de los brotes formados con agentes poliploidizantes, en condiciones controladas.

Esta especie mostró alta sensibilidad a los tratamientos de desinfección habituales. Este hecho, y la alta contaminación fúngica y bacteriana observada, indicaron la necesidad de elaborar estrategias de desinfección alternativas, combinando biocidas químicos, como el PPM, con lavandina comercial diluída y/o la adición de AAS en el medio de cultivo. Esta combinación resultó efectiva ya que evitó los problemas observados. Una vez retirado el AAS del medio, los brotes recuperaron su aspecto normal continuando su crecimiento (Fig. 3). En conclusión, el tratamiento 8 fue el único que permitió recuperar brotes más allá de los 90 días de cultivo, en el resto, tal como se indica en la Tabla 1, independientemente de la eficiencia observada los brotes se perdieron por oxidación o contaminación.

Los segmentos nodales generaron, en todos los tratamientos, a excepción del M6, el desarrollo de callos que, creciendo desde la inserción de la hoja cubrieron las yemas laterales. Este hecho sugiere que los mismos producirían una cantidad importante de auxinas. Una evidencia indirecta de ello es que, una vez separado el explanto del callo, éste fue perdiendo capacidad de crecimiento y finalmente se necrosó (Fig. 1b). Experimentos posteriores aplicando anti-auxinas mostraron que si bien se evitó la formación de callos, no se observó el desarrollo de las yemas laterales (datos no presentados).

La concentración de BAP aplicada en M6 fue adecuada para promover el desarrollo de yemas. La tasa de multiplicación de brotes fue diferente entre el material inducido y el no inducido. El material preinducido produjo, en primer subcultivo, hasta 3 brotes por explanto (Fig. 2c), mientras que el material no inducido sólo fue capaz de generar uno. La eliminación del ápice, cambia la dominancia apical, modifica la relación auxina/

citocininas y, como consecuencia, se desinhiben de las yemas laterales.

Los brotes adventicios se desarrollaron desde la base del explanto. Si todos hubieran desarrollado, se habrían obtenido entre 6 y 7 yemas por explanto (Fig. 3). La tasa de multiplicación final de 2,5 indica que sería interesante buscar las condiciones adecuadas para incrementar la eficiencia de multiplicación aún más. Los brotes con fenotipo normal podrían servir como fuente de explantos para la micropropagación a partir de micro segmentos.

En los tratamientos que contenían ANA (R_2 y R_4), *in vitro*, se observó un efecto negativo sobre los brotes. Las yemas no sólo no mostraron ningún tipo de desarrollo sino que se hizo notorio un estado de deterioro generalizado, principalmente en las hojas. Además, la tasa de enraizamiento fue mayor en los medios libres de hormona, tratamientos R1 y R3 (Tabla 3). Por el otro lado, la estrategia del enraizamiento por esquejes *ex vitro*, resultó la más eficiente en cuanto a la producción de plántulas enraizadas (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de diferentes tratamientos en el enraizamiento de Santa Rita.

Tratamiento	Medio	Sustrato	Hormona	Tasa ¹
R1	MS	Agar (4g/l)	No	0,15
R2	MS	Agar (4g/l)	ANA (5,0 mg/l)	0
R3	MS 0,25X	Agar (4g/l)	No	0,1
R4	MS 0,25X	Agar (4g/l)	ANA (5,0 mg/l)	0
R5	No	Growing Mix	No	0,6

El uso de la cámara húmeda y de sustrato artificial fue una alternativa adecuada. No sólo fue posible recuperar el 60% de las plantas enraizadas, sino que este proceso tiene la ventaja de facilitar la etapa de aclimatación. Todas las plantas enraizadas se aclimataron exitosamente y se transfirieron a invernáculo. Esta estrategia de enraizamiento está basada en la clásica técnica de propagación *in vivo* de Santa Rita. Asimismo, cuando Murashige (1974) propuso las 3 etapas de la micropropagación, ya había anticipado que la etapa de enraizamiento se podría realizar *in vitro* o *ex vitro*. El enraizamiento directo se utiliza en la micropropagación a gran escala de especies ornamentales ya que implica una importante disminución en los costos (Villalobos y Thorpe, 1991).

En relación con los cambios morfológicos observados principalmente en las hojas, éstos fueron ocurriendo en forma paralela a la disminu-

ción de BAP en los sucesivos subcultivos (Figs. 2b, c y 3b). Dentro de un marco de patrones de desarrollos naturales, ha sido demostrado que el de cada nodo está genéticamente controlado y modulado por el estado fisiológico de la planta y los cambios en los factores ambientales (Poethig, 1997). En la micropropagación se induce un nuevo patrón de desarrollo que es controlado por los reguladores del crecimiento exógenos (factores ambientales) que nos permiten dirigir las respuestas hacia objetivos deseados, en este caso inducir el desarrollo de yemas y evitar la formación de callo. Es posible conjeturar que a medida que los brotes *in vitro* se exponían a menores concentraciones de BAP, se iba normalizando el fenotipo de las hojas.

Se ha elaborado un protocolo para la micropropagación de Santa Rita combinando técnicas *in vitro* con técnicas *ex vitro*. Este desarrollo podría ser el punto de partida de un programa de mejoramiento. Dado que las variedades de interés comercial son estériles bajo las condiciones climáticas de Argentina, nuestros resultados abren la posibilidad de aplicar una estrategia de poliploidización *in vitro* a fin de restaurar la fertilidad o bien aumentar el tamaño de hojas y flores, incrementando el valor ornamental de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue llevado a cabo en el marco del proyecto: «Desarrollo de la Floricultura en la Argentina», financiado por el acuerdo INTA-JICA. Los autores agradecen a la Sra. Sara Ostertag y al Sr. Martín Saragoiti por su colaboración técnica.

REFERENCIAS

- JAVED, A.; HASSAN, S. & NAZIR, S.** 1996. In vitro propagation of *B. spectabilis* through shoot apex culture. Pakistan J.Bot.28 (2): 207-211.
- MURASHIGE, T.** 1974. Plant propagation through tissue culture.. Ann. Rev. Plant. Physiol.. 25:135-166.
- MURASHIGE, T. Y SKOOG, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Pl. 15: 473-497.
- NOTSUKA, K.; TSURU, T. Y SHIRAISHI, M.** 2000. Induced polyploid grapes via *in vitro* chromosome doubling J. Japan Soc. Hort. Sci.: 69 (5): 543-551.

- POETHIG, R.S.** 1997. Leaf morphogenesis in flowering plants. *Plant Cell*, 9:1077-1087.
- SHARMA, R.Y DHIR, K.K.** 1985. In vitro culture of axillary buds of Bougainvillea cultivar "Mary". *Indian J.Plant. Physiol. Ju* (2): 169-176.
- STEFFEN, J.; SACHS, R.Y HACKETT, W.** 1988a. Growth and development of reproductive and vegetative tissues of Bougainvillea cultured in vitro as function of carbohydrate. *Amer. J. Bot.* 75 (8): 1219-1224.
- STEFFEN, J.; SACHS, R. Y HACKETT, W.** 1988b. *Bougainvillea* inflorescence meristem development: comparative action of GA, *in vivo* and *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 75 (8): 1225-1227.
- VILLALOBOS, V.M. y THORPE, T.A.** 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Cap. 6 Editado por Roca, W. y Mrojinski, L. CIAT, Bogotá, Colombia.
- ZADDO, S.N.; PROY, R.P. y KHOSHOO, T.N.** 1975. Cytogenetics of cultivated Bougainvilleas. V. Induced tetraploidy and restoration of fertility in sterile cultivars. *Euphytica*, 24: 517-524.