

## **Propagación in vitro de plantas de crisatemo (*Dendranthema grandiflorum*) de la variedad Palisade**

**Daorden, M.E<sup>1</sup>; Branbilla, M.V<sup>1</sup>.; Fasce, M<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>INTA EEA San Pedro, CC N° 43. Ruta 9 Km. 170, CP 2930 San Pedro, Buenos Aires, Argentina.

E-mail: daorden@correo.inta.gov.ar

<sup>2</sup>INTA UEEA Escobar, Colectora este 1151, CP 1625, Escobar, Buenos Aires, Argentina.

### **Introducción**

El crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) es una especie ornamental que se cultiva para el uso de su flor o para maceta. La propagación de esta especie es agámica a través de esquejes que se extraen de plantas mantenidas en desarrollo vegetativo. Esta forma de multiplicación lleva a la difusión de enfermedades cuando las plantas madres están enfermas.

La enfermedad conocida como peste negra es una enfermedad causada por distintos virus que pertenecen al género *Tospovirus* (German *et al.*; 1992). Los síntomas de esta enfermedad en plantas de crisantemo particularmente en la variedad Palisade fueron descritos por Dal Bo *et al.*; 1999.

El objetivo de este trabajo fue la elaboración de un protocolo para la obtención de plántulas *in vitro* a partir de cultivo de ápices meristemáticos con la finalidad de disponer de plantas de sanidad controlada.

### **Materiales y Métodos**

Se utilizaron ápices meristemáticos (0.3-0.5 mm) obtenidos de brotes apicales de plantas de crisantemo var. Palisade de 3-5 meses. Luego de la desinfección superficial se ubicaron en tubos con medio de Murashige y Skoog (1962) (en adelante MS) suplementado con (en mg.l<sup>-1</sup>) mioinositol

## 5. Propagación: macro y micropropagación

(100), tiamina HCl (0,4), sacarosa (30.000), agar (7.000) y con diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) ajustado a un pH de 5,7 ± 0,1.

Los tratamientos fueron: 1.- MS sin reguladores de crecimiento; 2.- MS + 0,5 mg.l<sup>-1</sup> BAP;

3.- MS + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP; 4.- MS + 0,5 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 1 mg.l<sup>-1</sup> AG<sub>3</sub>; 5.- MS + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 1 mg.l<sup>-1</sup> AG<sub>3</sub>. Se sembraron 10 ápices por tratamiento con tres repeticiones.

A los 45 días de la siembra *in vitro* del ápice se evaluó porcentaje de contaminación, porcentaje de regeneración de plántula y porcentaje de explantos que presentaban crecimiento de tejido indiferenciado (callo).

Las plántulas logradas se subcultivaron a medios de multiplicación usando MS con igual suplementación y pH que para establecimiento. Se efectuaron 6 tratamientos:

1: MS sin reguladores; 2: MS + 0 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg.l<sup>-1</sup> ANA (Ácido Naftalén Acético); 3: MS + 0.1 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0 mg.l<sup>-1</sup> ANA; 4: MS + 0.1 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg.l<sup>-1</sup> ANA; 5: MS + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0 mg.l<sup>-1</sup> ANA; 6: MS + 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg.l<sup>-1</sup> ANA

El número de explantos por tratamiento fue de 30, ubicando 5 explantos en cada frasco. Los subcultivos (3) se efectuaron cada 4 semanas mediante multiplicación axilar, y en cada uno de ellos se evaluó número de brotes obtenidos por explanto.

Los brotes regenerados con más de 2 cm. pasaron al medio de enraizamiento utilizando las sales de MS a la mitad de su concentración y ácido indol butírico (IBA) (0.1 mg.l<sup>-1</sup>). A las 4 semanas de cultivo se registró el porcentaje de plántulas que produjeron raíces.

El material vegetal, en tubos o frascos según etapa, se ubicó en cámara de cultivo a 23-25°C, con una intensidad lumínica de 35 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> durante 16 horas diarias suministradas con tubos de luz blanca fluorescente.

Las plántulas enraizadas *in vitro* se ubicaron en maceas plásticas (1,5 litros de capacidad) conteniendo sustrato Grow Mix ® identificadas con el número de meristema del cual provenían. Se dispusieron por 6 a 8 semanas dentro de un túnel plástico ubicado sobre una mesada en invernadero. Se evaluó porcentaje de sobrevivencia de plántulas.

El estado sanitario de los materiales obtenidos se comprobó mediante DAS ELISA. Se utilizaron reactivos, testigos positivos y negativos provistos por Bioreba® aplicándose el protocolo del proveedor. El anticuerpo usado fue policlonal de amplio espectro para los tospovirus TSWV, INSV, GRSV, y TCSV. Brotes apicales de las plantas ya ambientadas se molieron con buffer extracción en una dilución 1:10 y se mantuvieron a 0°C. La lectura de la placa se realizó a los 30 y 60 minutos de la siembra del sustrato. El punto crítico por el cual la muestra se consideró positiva, se calculó como el doble de la media del nivel de absorvancia a 410 nm del testigo sano, sembrado 6 veces en cada placa.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y los datos se analizaron con ANOVA y el test de comparación de medias de Tukey al 5%.

## Resultados y discusión

La combinación BAP y AG<sub>3</sub> del tratamiento 5 (Tabla 1) mostró ser óptimo para la regeneración de plántulas a partir de ápice meristemático, originando brotes vigorosos a los 45 días de cultivo. En dicho tratamiento el % de sobrevivencia fue el más alto (datos no mostrados), así como también el % de ápices que regeneraron plántulas (97%). La mayor regeneración de plántulas se produjo en presencia de AG<sub>3</sub> ya que promovió la división celular y la elongación en la zona subapical de los ápices (Sachs 1961).

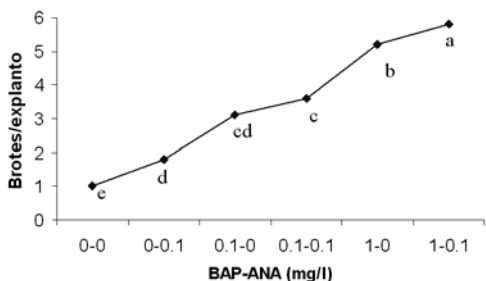
La formación de tejido indiferenciado fue más abundante en ausencia de AG<sub>3</sub>. En ausencia de reguladores de crecimiento no hubo formación de callo pero se vio comprometida la regeneración.

En la etapa multiplicación *in vitro*, se encontró una mayor respuesta en los tratamientos donde se utilizó la combinación de citocinina y auxina (Figura 1).

## 5. Propagación: macro y micropropagación

**Tabla 1:** Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la respuesta *in vitro* de ápices meristemáticos. Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas ( $p=0.05$ )

Tratamiento	% de contaminación	% de ápices que regeneraron plántulas	% de crecimiento de tallo
1.- MS sin reguladores de crecimiento	6,6 c	6,6 d	0
2.- MS + 0,5mg/l BAP	13,3 a	36,6 c	60 a
3.- MS + 1 mg/l BAP	6,6 c	63,33 b	76,6 a
4.- MS+ 0,5 mg/l BAP + 1 mg/l AG3	10 b	86,6 a	40 b
5.- MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l AG3	3,3 d	93,3 a	53 c



**Figura 1:** Efecto del medio de cultivo en el número de brotes por explanto (Promedio de 3 subcultivos). Valores con la misma letra no difieren significativamente  $p < 0,05$

La mejor relación citocinina/auxina para una abundante propagación fue de  $1\text{mg.l}^{-1} / 0,1\text{mg.l}^{-1}$  en concordancia con que una alta concentración de citocinina y una baja concentración de auxina promueve el crecimiento y el desarrollo de brotes en cultivo *in vitro* (Pierik, 1987). La cantidad de brotes axilares aumentó marcadamente con el incremento de la concentración de BAP (1,0 y 5,8 dependiendo del tratamiento) valores habituales para la especie (Ben Ja cob and Langhans 1972; Earle and Langhans, 1973). A bajas concentraciones de BAP ( $0.1\text{ m.l}^{-1}$ ) no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con o sin auxinas.

La aparición de raíces se produjo entre la 3<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> semana de cultivo en el 96% de las plántulas. El inicio de raíces se produjo entre una semana a 10 días más tarde en los explantos que provenían del tratamiento 5 (BAP 0,1 mg.l<sup>-1</sup> -ANA 0 mg.l<sup>-1</sup>). El porcentaje de sobrevivencia post *in vitro* fue del 92 % independientemente de los distintos tratamientos aplicados durante la etapa de multiplicación. Los altos porcentajes se debieron a una adaptación a las condiciones exteriores en forma progresiva mediante breves exposiciones diarias a humedad relativa baja que se aumentaban progresivamente (Marín, 2001). Con las pruebas serológicas usadas no se detectaron plantas infectadas. Sin embargo, las limitantes de esta técnica incluyen la existencia de cepas del patógeno que pueden no ser detectadas por el anticuerpo, la distribución no homogénea del virus dentro de la planta y la dificultad en detectar el patógeno en plantas asintomáticas. (Horst y Nelson 1997).

### **Conclusión**

Con las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas se aceleró notablemente la multiplicación de plantas. El desarrollo de un protocolo de trabajo que ha incluido establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*, así como aclimatación de las plántulas obtenidas permitió lograr una gran cantidad de plántulas entre las que no se detectaron plantas infectadas por los tospovirus analizados.

### **Bibliografía**

Ben Jacob. J and R.W. Langhans. 1972. Rapid multiplication of Chrysanthemum plants by stem-tip proliferation, HortScience, vol 7(3): 289-290.

Dal Bo, E., et. al. 1999. Tospovirus en los cultivos ornamentales de La Plata. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 104(1):35-40.

German, T.L., et. al. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. Annual Review of Phytopathology 30:315-348.

Earle E.D. and R.W. Langhans, 1973. Propagation of Chrysanthemum *in vitro*, I. Multiple plantlets from shoot tips and the

## 5. Propagación: macro y micropropagación

establishment of tissue cultures. Journal of American Society of Horticultural Science 99(2): 128-132.

Horst, R. K. y Nelson, P. E. 1997. Compendium of Chrysanthemum Diseases. APS Press 62 pags.

Marin, J.A. 2001. High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree roostocks by increasing exposures to low relative humidity. Acta Horticulturae

Murashige, T. and F. Skoog.1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

Pierik, R.I.M. 1987. Preparation and composition of nutriente media. Pierik R.I.M. (Ed), *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Pyblishers, Dordrecht, The Netherlands. 45-82.

Sachs, R.M. 1961. Gibberellin, auxin and growth retardante effects upon cell division and shoot histogenesis. Advance in Chemistry, series N° 28: 49-58.