

Organogénesis de *Argyranthemum frutescens* (L.) a partir de plantas cultivadas *in vitro* y *ex vitro* bajo diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento

Leticia Tombion^{1,2} *; María Andrea Coviella¹; Miguel Ángel Sangiacomo² y María Silvina Soto¹

¹ Instituto de Floricultura, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). N Repetto y De Los Reseros, Hurlingham (CP 1686), Bs. As., Argentina

² Universidad Nacional de Luján, Dpto. de Tecnología. Ruta 5 y Ruta 7 (CP 6700), Luján, Bs. As., Argentina.

*Autor por correspondencia: tombion.leticia@inta.gob.ar

Resumen

Argyranthemum frutescens (L.) Sch.Bip. (Asteraceae) es una especie ornamental de importancia comercial a nivel mundial. La micropropagación y la organogénesis han sido llevadas a cabo en muchas especies ornamentales de la familia Asteraceae. Estas técnicas de propagación *in vitro* ofrecen un alto potencial en las estrategias de mejoramiento genético de especies y variedades de alto valor comercial. Sin embargo, el resultado del cultivo de tejidos vegetales se encuentra influenciado por el ambiente físico, químico y gaseoso en el que se encuentren las plantas madre, y por las características del medio de cultivo a utilizar. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la micropropagación de *A. frutescens* mediante organogénesis directa e indirecta a partir de meristemas apicales de acuerdo con el ambiente en el que se encontraba la planta madre dadora de explantes y según diferentes dosis de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo base. Los explantes provenientes de plantas cultivadas *in vitro* presentan mayor capacidad de respuesta morfogénica que los provenientes de plantas cultivadas *ex vitro*, por lo que se resalta el cultivo de meristemas en el medio Murashige y Skoog (MS) + 0,5 mg l⁻¹ kinetina + 0,03 mg l⁻¹ ácido naftalenacético como la combinación de mayor respuesta a la regeneración de plantas mediante organogénesis directa y en MS + 0,5 mg l⁻¹ 6-bencilaminopurina + 0,03 mg l⁻¹ ácido indolbutírico para alcanzar la organogénesis indirecta.

Palabras claves: *Argyranthemum frutescens*, organogénesis, ambiente, cultivo de meristemas, regulador de crecimiento.

Abstract

Argyranthemum frutescens (L.) Sch.Bip. (Asteraceae) is an ornamental species of worldwide commercial importance. Micropropagation and organogenesis have been carried out on many ornamental species of the Asteraceae family. These propagation techniques offer a high potential in breeding strategies for species and varieties of high commercial value. However, the results of tissues culture are influenced by the physical, chemical, and gaseous environment in which the explant-giving plants are located, and by the medium culture characteristics. Therefore, the aim of this job was to study the micropropagation of *A. frutescens* by direct and indirect organogenesis from apical meristems according to the environment in which the mother plant was located and according to different doses of growth regulators in the base culture medium. Explants from *in vitro*-grown plants show greater morphogenic response capacity than those from *ex vitro*-grown plants, thus highlighting meristem culture in Murashige and Skoog (MS) medium + 0.5 mg l⁻¹ kinetin + 0, 03 mg l⁻¹ naphthaleneacetic acid as the combination with the highest response to plant regeneration by direct organogenesis and in MS + 0.5 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurine + 0.03 mg l⁻¹ indolbutyric acid to achieve indirect organogenesis.

Key Words: *Argyranthemum frutescens*, organogenesis, environment, growth regulator, meristem culture.

Introducción

El género *Argyranthemum* Webb ex Schütz-Bip pertenece a la familia Asteraceae, tribu Anthemidae. Es originario de las Islas Canarias e incluye 25 especies con numerosas subespecies (Kjos et al., 2010). Su cultivo como planta ornamental se ha vuelto popular en los últimos años (Schroeter y Kleiber, 2012), ya que se utiliza a nivel mundial como planta en maceta, como cubierta vegetal o para decorar jardines debido a su follaje, al color de sus flores y a su largo período de floración (Hu et al., 2020). *Argyranthemum frutescens* es una especie ornamental de importancia comercial con amplios programas de reproducción y multiplicación. Su propagación es vegetativa, por lo que precisa ser sometida a procesos de limpieza de enfermedades sistémicas, tales como las virosis (Kjos et al., 2010).

Las técnicas de propagación *in vitro* como la organogénesis o la embriogénesis somática ofrecen un gran potencial en las estrategias de mejoramiento genético de especies y variedades de alto valor comercial. Estas metodologías pretenden alcanzar la obtención de plantas con características genéticas y morfológicas deseadas (Pérez et al., 2008; Bustamante et al., 2022) y permiten la obtención de un alto número de plantas en corto tiempo (Salazar et al., 2005). En particular, la micropropagación y la organogénesis han sido llevadas a cabo en muchas especies ornamentales de la familia Asteraceae (Salazar et al., 2005). La organogénesis representa una de las posibles vías morfogénicas que permite la diferenciación de plantas (Pérez et al., 2008). Cuando la formación de brotes ocurre a partir del explante utilizado, sin la intervención de la fase de callo, se habla de organogénesis directa, mientras que cuando se observa la formación de callos en el explante (desdiferenciación del tejido) y la posterior generación de brotes a partir de su diferenciación, se trata de organogénesis indirecta (George & Debergh, 2008). La primera es una herramienta eficiente para propagar genotipos élite (Hernández et al., 2013) que, además, posibilita la producción de plantas con cualidades fitosanitarias que aseguran la calidad comercial (Castañeda-Castro et al., 2009), mientras que la segunda puede utilizarse en el mejoramiento genético de plantas, ya que posibilita la obtención de variantes genéticas

con resistencia o tolerancia a las adversidades del medio. Un callo es una masa amorfa de células indiferenciadas que puede tener potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que posteriormente formarán plantas. Su característica general de crecimiento abarca una compleja relación entre el explante, la composición del medio y las condiciones experimentales durante el período de incubación (Lallana y Lallana, 2003).

A diferencia del medio exterior, el ambiente *in vitro* se caracteriza por tener alta humedad relativa, humedad constante, bajos niveles de densidad de flujo de fotones, fluctuación en la concentración de CO₂, alta concentración de azúcar y ausencia de microorganismos. Generalmente, estas circunstancias causan bajos niveles de transpiración, de absorción de agua y nutrientes, y de CO₂, pero un alto nivel de respiración en la oscuridad, lo que desencadena un crecimiento celular escaso (Barbón Rodríguez, 2003). Por ello, las características fisiológicas y morfológicas de las plantas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso, el cual incidirá en la optimización de los procedimientos de micropropagación (Cañal et al., 2001). Además de ello, las características del medio de cultivo son determinantes para lograr un cultivo de tejidos exitoso. El agregado de reguladores de crecimiento al medio, tales como auxinas y citoquininas, posibilita el rápido desarrollo de las plantas *in vitro* (Aros et al., 2017), ya que interfieren en la diferenciación de tejidos, y en la inducción y formación de yemas y raíces (Duan et al., 2016).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la micropropagación de *A. frutescens* mediante organogénesis directa e indirecta a partir de meristemas apicales de acuerdo con el ambiente en el que se encontraba la planta madre dadora de explantes y según diferentes dosis de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo base, además de proporcionar un fundamento teórico para el cultivo de tejidos vegetales.

Materiales y métodos

Material vegetal

Esquejes de *A. frutescens* fueron colectados de plantas cultivadas en un invernáculo sin control de temperatura del Instituto de Floricultura del INTA, en Hurlingham (34°36'0" S; 58°37'60" O), Argentina, durante el otoño.

Artículos

Las temperaturas promedio registradas fueron de 20° C, bajo un fotoperíodo de 12 h. Por otro lado, se utilizaron plantas de *A. frutescens* de entre 8 y 13 cm de altura conservadas en condiciones *in vitro* en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) a 25°C de temperatura y bajo un fotoperíodo de 16 h.

Desinfección de los esquejes provenientes de plantas ex vitro

En primer lugar, los esquejes fueron llevados al laboratorio donde fueron cortados en fragmentos de 2 a 3 cm y lavados con agua. Posteriormente, las fracciones fueron sometidas a alcohol 70 % durante 10 s y transferidas a una solución 30 % (v/v) de hipoclorito de sodio por 10 min. Seguidamente, fueron desinfectadas con una solución de kasugamicina 0,27 % (v/v) durante 10 min y, finalmente, enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril bajo campana de flujo laminar.

Preparación de explantes

Los meristemas (0,5-0,8 mm) provenientes de las plantas cultivadas *in vitro* y de los esquejes desinfectados previamente fueron extraídos mediante bisturíes a partir de la ayuda de una lupa binocular (Nikon ® modelo SMZ-10, Tokio, Japón) en una cámara de flujo laminar. Se emplearon tubos de ensayo de 24 x 115 mm que fueron completados con 10 ml de medio de cultivo y se introdujo un meristema por cada tubo.

Tratamientos

Se utilizaron 8 tratamientos, los cuales fueron conformados según el ambiente en el cual se encontraba cultivada la planta madre (*in vitro* o *ex vitro*-en invernáculo-) en combinación con un medio de cultivo (compuesto por un medio base más un regulador de crecimiento) (Tabla 1). Cada medio fue ajustado a pH 5,6 y pasado en autoclave a 121 °C durante 17 min.

Tabla 1. Conformación de los diferentes tratamientos analizados

Tratamiento	Cultivo de la planta madre	Medio de cultivo
1	<i>In vitro</i>	MS (Murashige y Skoog, 1962)
2	<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ kinetina (KIN) + 0,03 mg l ⁻¹ ácido naftalenacético (ANA)
3	<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP) + 0,03 mg l ⁻¹ ácido indolbutírico (AIB)
4	<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA
5	<i>Ex vitro</i>	MS
6	<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA
7	<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB
8	<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA

Mantenimiento de explantes

Los tubos de ensayo que contenían los meristemas fueron llevados a una cámara de cultivo durante 60 días bajo un fotoperíodo de 16 h a una intensidad de 1000 lux y una temperatura constante de 25 °C para promover la diferenciación de tejidos.

Variables evaluadas

Sesenta días después de la extracción de los meristemas se registraron las siguientes variables:

- Organogénesis directa:
 - Regeneración de plantas (%): N° de explantes que lograron dar origen a una planta con más de una hoja verdadera, raíces y ausencia de callo/total de explantes;

- N° hojas/explante: cantidad de hojas obtenidas por cada explante (sin callo);
- Longitud radical: largo de la mayor raíz del explante (sin callo), medido en cm.
 - Organogénesis indirecta:
 - Formación de callo (%): N° de callos producidos/total de explantes;
 - Formación de brotes a partir de callo (%): N° de callos que lograron dar origen a brotes y raíces/total de explantes;
 - N° hojas: cantidad de hojas obtenidas a partir de callo
 - Longitud radical: largo de la mayor raíz originada a partir de callo, medido en cm.
 - Mortandad (%): cantidad de explantes muertos (de aspecto necrótico)/total de explantes.

Análisis estadístico

Se utilizaron 32 meristemas por cada tratamiento. Se realizó un diseño en bloques completamente aleatorizados con arreglo factorial 4x2. Las variables N° de hojas y longitud radical fueron transformadas a raíz cuadrada por no cumplirse los supuestos de normalidad y, a su vez, en el caso de n° de hojas, por ser un valor entero. Se realizó un análisis de la varianza con un nivel de confianza del 95 %. Al observar diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de diferencia de medias de Duncan ($p \leq 0,05$) mediante el software estadístico Infostat versión 2020 (Di Rienzo et al., 2020).

Resultados y discusión

Efecto del ambiente del material vegetal y de los medios de cultivo sobre la organogénesis directa

De acuerdo con el análisis estadístico, no hubo evidencia estadística de interacción en la regeneración de plantas. Esta variable estuvo influenciada por el ambiente del cual provenían los explantes, ya que aquellos que

procedían de plantas cultivadas *in vitro* lograron superar en un 8 % a los provenientes de plantas cultivadas en invernáculo (Tabla 2.a). Si en investigaciones futuras se tuviera como objetivo la regeneración de plantas, debería considerarse tomar el material meristemático de una fuente *in vitro*. Uribe et al. (2008) determinaron que las condiciones fisiológicas de la planta donante de explantes tiene una marcada influencia sobre la respuesta *in vitro*. Un entorno donde la temperatura es constante, la humedad elevada, la concentración de azúcares alta, la densidad del flujo de fotones baja y donde existe fluctuación de los niveles de CO₂, como lo es el cultivo *in vitro* (Barbón Rodríguez, 2003), posiblemente causó un balance de hormonas endógenas en las plantas dadoras de explantes que tuvo efectos benéficos para la regeneración de plantas, a diferencia de las plantas cultivadas *ex vitro*, cuya proporción de nutrimentos, de niveles hormonales y de aminoácidos libres varía de acuerdo con las distintas épocas del año (Jiménez-Martínez et al., 2013).

Tabla 2.a. Efecto del ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes sobre la regeneración de plantas de *A. frutescens* mediante organogénesis directa a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Ambiente de la planta madre	Regeneración de plantas (%)
<i>In vitro</i>	14 a
<i>Ex vitro</i>	6 b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Por otro lado, la composición de los medios también repercutió sobre la regeneración de plantas, ya que de acuerdo con los valores expresados en el Tabla 2.b, se puede notar que el medio MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA fue significativamente superior por lograr regenerar un 26 % de plantas (Figura 1 B, arriba), a diferencia del resto que no logró superar el 10 %. La kinetina es una citoquinina que posee un rol importante en varias fases del desarrollo de las plantas. Ello involucra la desinhibición y diferenciación de yemas, el

alargamiento celular y el flujo de asimilados y nutrientes (Lagoutte et al., 2009). Por tanto, si se considerara a la regeneración de plantas como un objetivo de importancia en próximas investigaciones, la combinación MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA debería ser tenida en cuenta. Similares resultados fueron encontrados por Zhang et al. (2015), quienes vieron que la presencia de una citoquinina combinada con ANA es indispensable para la regeneración y el desarrollo de los explantes.

Tabla 2.b. Efecto de los medios de cultivo sobre la regeneración de plantas de *A. frutescens* mediante organogénesis directa a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Medio de cultivo	Regeneración de plantas (%)
MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	0 a
MS	5 a
MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	10 a
MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	26 b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Artículos

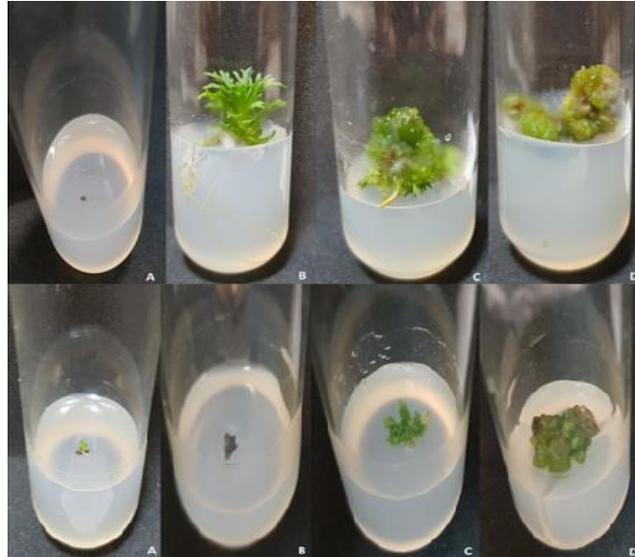


Figura 1. Diferencias de comportamiento de los explantes de *A. frutescens* en los medios MS (A), MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA (B), MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB (C) y MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA (D). Arriba: explantes provenientes de plantas cultivadas *in vitro*. Abajo: explantes provenientes de plantas cultivadas *ex vitro*

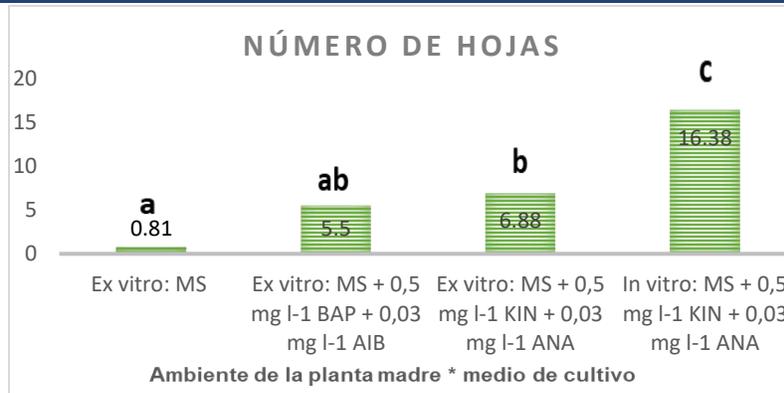
Con respecto a las variables morfométricas, según los resultados observados en el Tabla 3, se produjo una interacción significativa entre los medios de cultivo y el ambiente del cual provenían los explantes para el número de hojas y la longitud radical de las plantas regeneradas vía organogénesis directa. Los explantes del tratamiento *ex vitro*:MS y *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB lograron la menor cantidad de hojas, mientras que los tratamientos que contenían kinetina (*ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA) fueron estadísticamente superiores (Figura 2). Por su parte, la longitud radical de

estas plantas fue menor en los tratamientos *ex vitro*:MS, *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB y *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA, y significativamente superior en *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA (Figura 3). La kinetina es una citoquinina que estimula la generación de brotes axilares, así como también puede inducir la iniciación y la elongación de las raíces (Alcántara Cortéz et al., 2019), lo cual explicaría estos valores. Resultados similares obtuvieron Leiva Mora & Aleaga (2023), quienes mediante el agregado de KIN al medio de cultivo incrementaron el número de brotes de plantas de papa.

Tabla 3. Efecto de la interacción entre del ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y el medio de cultivo para número de hojas y longitud radical de plantas de *A. frutescens* obtenidas mediante las dos vías de organogénesis

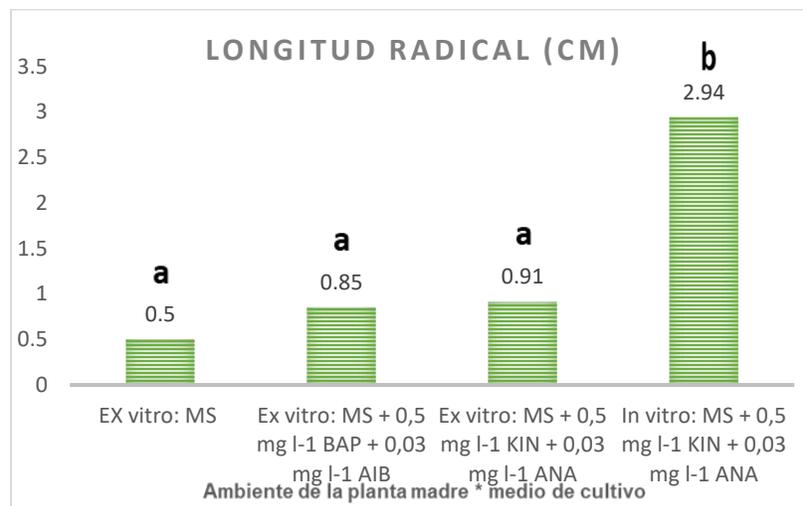
Interacción	Tipo de organogénesis	Nº hojas	Longitud radical
Ambiente de la planta madre x medio de cultivo	Directa	6,40*	5,21*
	Indirecta	5,33*	4,86*

*valor significativo nivel del 5% ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Figura 2. Número de hojas de las plantas regeneradas mediante organogénesis directa según el ambiente de la planta madre y el medio de cultivo



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Figura 3. Longitud radical de las plantas regeneradas mediante organogénesis directa según el ambiente de la planta madre y el medio de cultivo

Efecto del ambiente del material vegetal y de los medios de cultivo sobre la organogénesis indirecta

A partir de los resultados observados en el Tabla 4, se puede decir que existió interacción

significativa entre los medios de cultivo y el ambiente en el que se encontraban las plantas madre dadoras de explantes para la formación de callo y la formación de brotes a partir de callo.

Tabla 4. Efecto de la interacción entre el ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y los medios de cultivo para la formación de brotes a partir de callo y la formación de *A. frutescens*

Interacción	Formación de brotes a partir de callo	Formación de callo
Ambiente de la planta madre x medio de cultivo	4,26 *	3,82 *

*valor significativo nivel del 5% ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

De acuerdo con la Tabla 5, la formación de brotes a partir de callo no ocurrió en los meristemas cultivados en los tratamientos ex

vitro:MS, in vitro:MS, ex vitro:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA, in vitro:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA y ex vitro:MS + 0,5 mg

Artículos

l-1 BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA. Los tratamientos *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA produjeron brotes, pero no fueron estadísticamente superiores al medio *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB, que alcanzó la mayor producción de brotes a partir de callo (41 %).

Por otro lado, *in vitro*:MS y *ex vitro*:MS no formaron callo. El tratamiento *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA fue significativamente similar, pero también fue semejante estadísticamente *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA. Los tratamientos *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB consiguieron generar callo en un 30 y un 59 %, respectivamente. Por su parte, los tratamientos *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA y *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA alcanzaron los mayores valores de producción de callo (Tabla 5). En el cultivo de tejidos vegetales, las auxinas y las citoquininas, especialmente, interactúan en varios procesos del desarrollo de las plantas y juntas pueden alterar la morfogénesis del vegetal (Nordström et al., 2004). Si se

considerara a la formación de callo como un objetivo de futuras investigaciones, las combinaciones de MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB y de MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA brindan adecuados resultados con el material proveniente de *in vitro*, al igual que la combinación MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA *ex vitro*. Las auxinas como el ANA y el AIB tienen un rol importante en la formación de estos tejidos no organizados, de los cuales también es posible inducir la formación de hojas, además de participar activamente en la formación de raíces (Jordán y Casaretto, 2006). Similares respuestas se encontraron en otros estudios, donde vieron que ANA y BAP en el medio de cultivo también inducían la formación de callo y la producción de brotes a partir de callo (Duan et al., 2016). Por su parte, Fajinmi et al. (2014) encontraron la mayor producción de callo en los medios de cultivos conformados por auxinas, principalmente en los que contenían ANA, mientras que Córdova et al. (2014) encontraron que la combinación de una auxina fuerte (2,4-D) con BAP es suficiente para inducir la formación de callo *in vitro*.

Tabla 5. Efecto del ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y del medio de cultivo sobre la formación de brotes a partir de callo y la formación de callo a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Ambiente de la planta madre	Medio de cultivo	Formación de brotes a partir de callo (%)	Formación de callo (%)
<i>In vitro</i>	MS	0 a	0 a
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	0 a	6 ab
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	41 c	59 d
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	25 b	72 d
<i>Ex vitro</i>	MS	0 a	0 a
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	0 a	21 bc
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	17 b	30 c
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	0 a	78 d

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p>0,05) de acuerdo con la prueba de Duncan

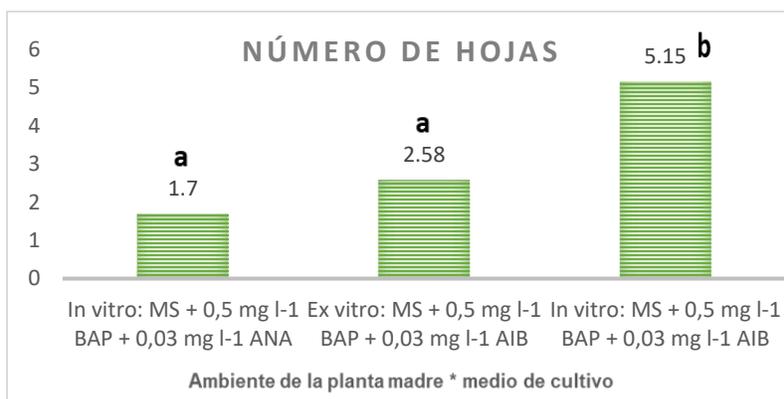
En cuanto a las variables morfométricas, según los resultados observados en el Tabla 3, se produjo una interacción significativa entre los medios de cultivo y el ambiente del cual provenían los explantes para el número de hojas y la longitud radical de las plantas regeneradas vía organogénesis indirecta. Los

explantes del tratamiento *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB lograron obtener el mayor número de hojas a partir de callo (5) en comparación con los tratamientos restantes (*in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA y *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB), los cuales no lograron superar las 2

Artículos

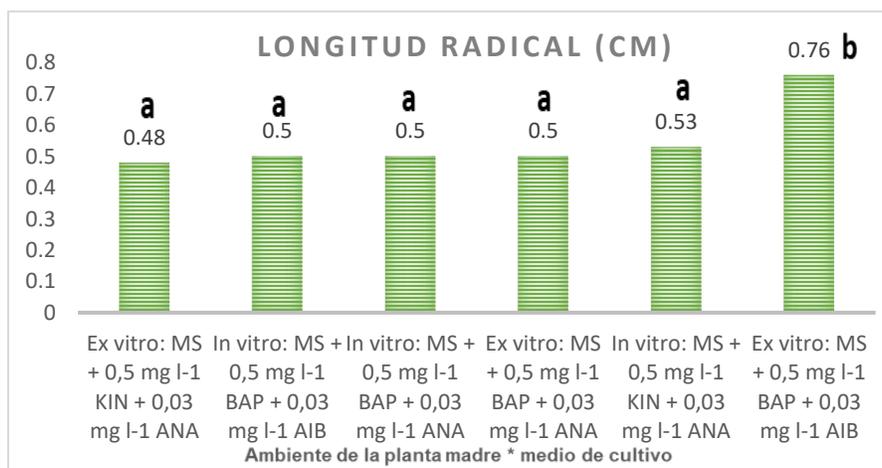
hojas (Figura 4). Con respecto a la longitud radical, el tratamiento *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB fue estadísticamente superior al resto, por haber producido una longitud media de 0,76 cm (Figura 5). Tanto BAP como AIB pudieron haber sido los responsables de la obtención de los mayores valores logrados para número de hojas y longitud radical, ya que ambas se encontraban presentes en los tratamientos superiores. Las citoquininas juegan un rol importante en diferentes fases del desarrollo de las plantas,

como la desinhibición y diferenciación de yemas, el alargamiento celular y el flujo de asimilados y nutrientes, por lo que producen mayor cantidad de ramificaciones y mayor producción aérea de las plantas (Lagoutte et al., 2009), mientras que las auxinas son promotoras de la división y la elongación celular, y de la formación de raíces si se emplea en bajas concentraciones según el requerimiento del material vegetal (Jordán y Casaretto, 2006).



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Figura 4. Efecto de la interacción entre el ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y el medio de cultivo sobre el número de hojas de plantas de *A. frutescens* obtenidas mediante organogénesis indirecta a los 60 días de la introducción in vitro de los meristemas



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Figura 5. Efecto de la interacción entre el ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y el medio de cultivo sobre la longitud radical de las plantas de *A. frutescens* obtenidas mediante organogénesis indirecta a los 60 días de la introducción in vitro de los meristemas

Artículos

Efecto del ambiente del material vegetal y de los medios de cultivo sobre la mortandad

Según la Tabla 6, existió interacción significativa entre los medios de cultivo y el ambiente en el que se encontraban las plantas madre dadoras de explantes para la variable mortandad. Los tratamientos *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB, *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB, *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA obtuvieron los menores valores. Por su parte, los tratamientos *ex vitro*:MS e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA fueron estadísticamente similares entre sí y semejantes, también, al tratamiento *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA (Tabla 7). Nas y Read (2004) indicaron que la composición del medio de cultivo puede causar desórdenes fisiológicos o la muerte de los tejidos debido a que la interacción entre los reguladores de crecimiento y las sales minerales utilizadas tiene un papel clave en el éxito de la micropropagación. El tratamiento que logró la mayor mortandad (63 %) fue *in vitro*:MS (Figura 1 A, arriba), lo cual pudo deberse a la composición del medio. Al no contar con reguladores de crecimiento, los explantes no lograron adquirir los nutrientes requeridos para alcanzar su desarrollo y, en consecuencia, se necrosaron (Surakshita et al., 2019). Por tanto, el agregado de reguladores de crecimiento al medio, como BAP combinado con ANA o AIB, podría aumentar la supervivencia de los explantes en experimentos futuros.

Tabla 6. Efecto de la interacción entre el ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y los medios de cultivo para la mortandad de *A. frutescens*

Interacción	Mortandad
Ambiente de la planta madre x medio de cultivo	6,24*

*valor significativo nivel del 5% ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Tabla 7. Efecto del ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y del medio de cultivo sobre la mortandad a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Ambiente de la planta madre	Medio de cultivo	Mortandad (%)
<i>In vitro</i>	MS	63 c
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	25 ab
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	6 a
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	16 a
<i>Ex vitro</i>	MS	22 ab
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	41 b
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	10 a
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	6 a

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Conclusión

Los explantes de *A. frutescens* provenientes de plantas cultivadas *in vitro* presentan mayor respuesta morfogénica que los provenientes de plantas cultivadas *ex vitro*. El cultivo de meristemas en el medio MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA es una combinación adecuada para la regeneración de plantas mediante organogénesis directa, mientras que

el medio MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB es apropiado para alcanzar la organogénesis indirecta. Estos avances quedan disponibles para futuras investigaciones en las que se desee implementar el cultivo de tejidos como técnica de saneamiento, de micropropagación o para el mejoramiento vegetal de *A. frutescens*.

Referencias

- Alcantara Cortes JS, Acero Godoy J, Alcántara Cortés JD, Sánchez Mora RM (2019) Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova* 17 (32):109-129.
- Aros D, Vasquez M, Rivas C & Prat ML (2017) An efficient method for *in vitro* propagation of *Astroemeria pallida* Graham rhizomes. *Chilean Journal Agricultural & Animal Sciences* 77(1):95-99. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000100012>.
- Barbón Rodríguez, R (2003) Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 3(4):211-221.
- Bustamante K, Rocha SP, Sharry SE, Guerra MP & Niella FO (2022) Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC. *Revista De La Facultad De Agronomía* 121 (Especial 2): 102. <https://doi.org/10.24215/16699513e102>
- Cañal MJ, Rodríguez R, Fernández B, Sánchez R & Majada JP (2001) Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal* 1:3-9.
- Castañeda-Castro O, Gómez FC, Trejo-Téllez L, Pastelín-Solano MC, Martínez Y, González MT & Guevara-Valencia M (2009) Estado nutrimental y crecimiento de vitroplantas de caña de azúcar en respuesta a reguladores de crecimiento. *Terra Latinoamericana* 27 (3):177-185.
- Córdova AM, Cobos M, Imán SA & Castro JC (2014) Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria* 5: 25-34. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.03>.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L & Tablada M (2020) Grupo Infostat. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Duan H, Ding W, Song J, Xu J, Wang H, Zhu Y, Liu W & Zhou Y (2016) Roles of plant growth substance in callus induction of *Achyranthes bidentate*. *Research in Plant Biology* 6:6-13. <https://doi.org/10.19071/ripb.2016.v6.3079>
- Fajinmi SO, Amoo S & Van Staden F (2014) Optimization of *in vitro* propagation of *Coleonema album*, a highly utilized medicinal and ornamental plant. *South African Journal of Botany* 94:9-13. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.05.006>
- George EF & Debergh PC (2008) Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.J D. (eds). *Plant propagation by tissue culture*. pp. 29-64.
- Hernández E, López MCG & Estrada-Luna AA (2013) Callogenesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS *in vitro*: establecimiento, inducción y proliferación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(8):1175-1186.
- Hu J, Jin Q & Ma Y (2020) *AfLFY*, a *LEAFY* homolog in *Argyranthemum frutescens*, controls flowering time and leaf development. *Science Report* 10:1616. doi: 10.1038/s41598-020-58570-x.
- Jiménez-Martínez JH, Gutiérrez MG, Franco O, González-Huerta A & Gutiérrez-Ibáñez AT (2013) Micropropagación de vides silvestres (*Vitis* spp.) del centro de México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82:107-112.
- Jordán M & Casaretto, J (2006) Fisiología vegetal. Capítulo XV. Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Kjos M, Fjellheim S, Rognli O & Hvoslef-Eide AK (2010). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers for fingerprinting of *Argyranthemum frutescens* cultivars. *Scientia Horticulturae* 124 (4): 506-510. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.02>
- Lagoutte SM, Divo M & Vilella F (2009) Efecto del tamaño de celdas y citoquininas en el crecimiento de plantas de petunia. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 78: 31-36.

Artículos

Lallana VH & Lallana MC (2003) Inducción de callos utilizando la técnica de cultivo *in vitro*. Manual de prácticas de fisiología vegetal. Ed. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. Argentina. Pp. 81-82.

Leiva Mora M & Aleaga PI (2023) Influencia de fitohormonas en la regeneración *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. vía organogénesis directa. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/37455>, fecha de último acceso: 19/09/23.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Nas MN & Read PE (2004) A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae* 101: 189-200.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.10.004>

Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K & Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:8039-8044. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402504101>

Pérez M, Armas R, Delgado, M & Hernández

CA (2008) Organogénesis indirecta a partir de meristemos apicales caulinares de la variedad cubana de arroz Reforma. *Cultivos Tropicales*, 29 (1): 23-28.

Salazar R, Vargas, TE, De García, E & Oropeza, M (2005) Micropropagación y organogénesis de *Aster ericoides* cultivar "Monte Cassino". *Interciencia* 30 (5): 295-299.

Schroeter A & Kleiber T (2012) Application of Slow-Release Fertilizers in Growing Marguerite Daisy (*Argyranthemum frutescens*) Molimba® Group. *Ecological Chemistry and Engineering* 19(12):1471-1484.
[https://10.2428/ecea.2012.19\(12\)140](https://10.2428/ecea.2012.19(12)140)

Surakshita NC, Soorianathasundarama K, Ganga M & Ravendran M (2019) Alleviating shoot tip necrosis during *in vitro* propagation of grape cv. Red Globe. *Scientia Horticulturae* 248:118-125.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.013>

Uribe ME, Delaveau C, Garcés M & Escobar R (2008) Effect of asepsis and phytohormones on the *in vitro* establishment of *Berberidopsis corallina* from nodal segments. *Bosque* 29:58-64.

Zhang A, Wang H, Shao Q, Wangshu M & Li M (2015) Large scale *in vitro* propagation of *Anoectochilus roxburghii* for commercial application: Pharmaceutically important and ornamental plant. *Industrial Crops and Products* 70:158-162.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.032>