

PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Alstroemeria* var. 'FIESTA DE 15 INTA' A PARTIR DEL CULTIVO DE MERISTEMAS DE RIZOMA

IN VITRO PROPAGATION OF *Alstroemeria* var. 'FIESTA DE 15 INTA' FROM RHIZOME MERISTEMS

Leticia Tombion^{1*}, María Silvina Soto¹, Marcela Mori¹, Anabela Mira¹, Gabriela Facciuto¹

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Floricultura. 1686, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

* Autor para correspondencia E-mail: tombion.leticia@inta.gob.ar

RESUMEN

Alstroemeria (*Alstroemeriaceae*) es un género nativo de Sudamérica. Sus especies, que se distribuyen desde Venezuela hasta Argentina y Chile, tienen alto impacto en el mercado de plantas ornamentales, debido al color y atractiva forma de sus flores. El cultivo in vitro de meristemas aumenta la eficiencia de la propagación de las plantas y su calidad, por contribuir con el saneamiento de enfermedades sistémicas. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un protocolo eficiente de cultivo in vitro de meristemas de rizoma de *Alstroemeria híbrida* var. Fiesta de 15 INTA, a partir del agregado de reguladores de crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a un medio de cultivo base. Se evaluó la cantidad total de plantas completas alcanzadas, producción de hojas, longitud aérea y radical, formación de callo, necrosis y mortandad de los explantos sembrados sobre MS; MS + 1 mg L⁻¹ BAP; MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA; y MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA + 1 mg L⁻¹ BAP. Se realizó un análisis de la varianza y la evaluación de diferencias entre medias por el test de Tukey. La suplementación de 0,2 mg L⁻¹ ANA al medio MS es suficiente para el cultivo de meristemas de rizoma de *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA, ya que su empleo resultó en una mayor producción aérea y radical y, consecuentemente de plantas completas, además de un alto porcentaje de sobrevivencia de plantas luego de su transferencia al invernáculo.

Palabras clave: *Alstroemeria*, cultivo de meristemas, micropropagación, reguladores de crecimiento, bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA).

ABSTRACT

Alstroemeria (*Alstroemeriaceae*) is a genus endemic to South America. Its species, which are distributed from Venezuela to Argentina and Chile, have a high impact on the ornamental plant market because of the color and attractive shape of their flowers. In vitro culture of meristems increases the efficiency of plant propagation and quality by contributing to the cleaning of systemic diseases. The present study aimed to develop an efficient protocol for rhizome meristems culture of *Alstroemeria híbrida* var. Fiesta de 15 INTA with the addition of growth regulators bencilaminopurine (BAP) and naftalenacetic acid (NAA) to a base culture medium. Whole plants, leaf production, shoot and root length, callus formation, necrosis and mortality of explants planted on MS; MS + 1 mg L⁻¹ BAP; MS + 0.2 mg L⁻¹ NAA; and MS + 0.2 mg L⁻¹ NAA + 1 mg L⁻¹ BAP were evaluated. An analysis of variance and evaluation of differences between means were performed by the Tukey test, which indicated that an efficient method for the micropropagation of *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA consists

of MS supplemented with 0.2 mg L⁻¹ NAA. This procedure resulted in a greater shoot (aerial) and root (radical) growth and, consequently, in a higher number of whole plants as well as a high plant survival rate after transfer to the greenhouse.

Key words: *Alstroemeria*, meristem culture, micropropagation, growth regulator, benzylaminopurine (BAP), naftalenacetic acid (NAA).

INTRODUCCIÓN

Alstroemeria es un género nativo de Sudamérica, perteneciente a la familia *Alstroemeriaceae*, cuyas especies se distribuyen desde Venezuela hasta Argentina y Chile, y pueden habitar desde el nivel del mar hasta los 4500 m de altitud (Cajas et al., 2009). Se caracterizan por ser perennes, presentar bajos requerimientos de nutrientes, larga vida en florero y flores de atractivas formas y diferentes colores (Khaleghi et al., 2008). Estos atributos permiten que su producción mundial permanezca en aumento (Hassani-Mehraban et al., 2019), ya que es un género de alto impacto en el mercado comercial de plantas ornamentales, principalmente por venta para flores de corte y, en menor medida, para macetas (Cajas et al., 2009; Aros et al., 2017).

La propagación de los cultivares comerciales de *Alstroemeria* se realiza mediante la división de rizomas (Spence et al., 2000; Pumisitapon et al., 2012) porque los brotes vegetativos y generativos se inician a partir de estos órganos subterráneos que se ramifican de manera simpodial (Kim, 2005). Sin embargo, esta forma de multiplicación tiene como desventaja el alto consumo de tiempo de trabajo, la baja eficiencia de propagación y el elevado riesgo de diseminación de enfermedades sistémicas, tales como los virus, lo cual en conjunto afecta notablemente la calidad y el rendimiento del cultivo (Aros et al., 2017). La propagación in vitro ha sido desarrollada para dar respuesta a estos problemas. Se ha visto que el sistema de micropropagación mediante fragmentos o meristemas de rizomas ha logrado reducir aquellas limitaciones (Lin et al., 2000; Hamidoghli et al., 2007). A pesar de ello, las características del medio de cultivo son determinantes para obtener una micropropagación exitosa. En particular, 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).

En la actualidad, el Instituto de Floricultura del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la Argentina lleva a cabo un plan de mejoramiento genético de *Alstroemeria* con la finalidad de obtener cultivares ornamentales adaptados a las condiciones del mercado local. Recientemente, ha desarrollado la variedad

denominada 'Fiesta de 15 INTA' que se caracteriza por poseer inflorescencias formadas por 5-6 flores pequeñas de color rosa suave (74D) y 4,7 ± 0,2 cm de tamaño con hojas elípticas cortas y angostas. Las varas poseen una post cosecha óptima y la particularidad de mantener el color verde del parénquima foliar por 15 días en florero. Estas características hacen que sean plantas aptas para uso como acompañantes en ramos florales.

A modo de hacer más eficiente la propagación agámica de las variedades de *Alstroemeria* originadas en el INTA, y de obtener un plantel de plantas madre de mayor calidad, en este estudio se propuso desarrollar un protocolo eficiente de cultivo in vitro de meristemas de rizoma de *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA a partir del agregado de auxinas y citoquininas a un medio de cultivo base.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Rizomas de *Alstroemeria híbrida* var. Fiesta de 15 INTA fueron colectados de macetas ubicadas en un invernáculo del Instituto de Floricultura del INTA, en Hurlingham (34°36'0" S; 58°37'60" O), Argentina.

Desinfección de rizomas

En primer lugar, las plantas fueron trasplantadas a macetas cuyo soporte estaba compuesto únicamente por vermiculita, a fin de quitar mediante el agua de riego el excedente de sustrato proveniente del cultivo anterior, y mantenidas en invernáculo durante dos semanas. Posteriormente, los rizomas fueron llevados al laboratorio donde fueron cortados en fragmentos de 2 a 3 cm y lavados con agua y la ayuda de un cepillo de cerdas finas. Las fracciones permanecieron en alcohol 70% durante 10 segundos y se transfirieron a una solución 30% (v/v) de hipoclorito de sodio por 10 minutos. Seguidamente, fueron desinfectadas con una solución de kasugamicina 0,27% (v/v) durante 10 minutos y, finalmente, enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril bajo campana de flujo laminar.

Preparación de explantos

Meristemas de 0,5-0,8 mm de longitud fueron

extraídos de los fragmentos de rizoma 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 sembró 1 meristema por cada tubo.

Tratamientos analizados

Los explantos fueron sembrados sobre los medios MS (Murashige y Skoog, 1962); MS + 1 mg L⁻¹ bencilaminopurina (BAP); MS + 0,2 mg L⁻¹ ácido naftalenacético (ANA); y MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA + 1 mg L⁻¹ BAP. Cada uno fue ajustado a pH 5,6 y pasado en autoclave a 121°C durante 17 minutos.

Mantenimiento de explantos

Todos los tubos se mantuvieron en oscuridad durante una semana y luego fueron llevados a una cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h de luz (1000 lux) y una temperatura constante de 25°C durante 20 días. A los 30 días de la siembra todos los explantos que manifestaron crecimiento fueron transferidos a un medio compuesto por MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA, por ser las auxinas las principales promotoras del desarrollo radical (Jordán y Casaretto, 2006).

Transferencia al invernáculo

Luego de 9 semanas, los explantos que desarrollaron plántula completa (aquellos con más de 1 hoja verdadera y raíces) fueron trasplantados a macetas que contenían sustrato compuesto a base de turba de musgo Sphagnum, compost de corteza fina, perlita y cenizas (tabaco Growmix ®), y se cubrieron con bolsas de polietileno transparentes para afrontar el período de adaptación en un invernáculo de aclimatación.

Transcurridos 10 días se retiraron gradualmente las bolsas y las plantas fueron llevadas al invernadero de producción.

Análisis estadístico

Los tubos de ensayo se distribuyeron en forma aleatoria dentro de la cámara de cultivo y se emplearon 15 explantos por tratamiento. La normalidad de los datos fue corroborada mediante el software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2009) y luego se llevó a cabo un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%. Al observar diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de diferencia de medias de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de BAP y ANA sobre producción de plántulas completas, formación de callo y mortandad de explantos

La adición de 0,2 mg L⁻¹ ANA al medio de cultivo MS logró regenerar la mayor cantidad de plántulas completas (34/45), lo que representa un 76% sobre el total de los explantos sembrados (Tabla 1). Estos resultados no concuerdan con los observados por Aros et al. (2017), quienes argumentaron que la citoquinina BAP es la principal promotora de la brotación del rizoma y del crecimiento in vitro de las plantas de *Alstroemeria*. A pesar de ello, se ha visto que el efecto óptimo de las citoquininas varía según su concentración y el material vegetal utilizado. A mayores concentraciones, estos reguladores de crecimiento pueden disminuir la tasa de multiplicación y la calidad de los explantos, así como también inhibir la formación de raíces (Chamorro et al., 2007), lo cual pudo haber sido la causa de la menor producción de plántulas

Tabla 1. Efecto de BAP y de ANA sobre regeneración de plántulas completas, formación de callo y mortandad de explantes de *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA a los 60 días del cultivo in vitro de meristemas.

Table 1. Effect of BAP and ANA on the regeneration of whole seedlings, callus formation and death of explants from *Alstroemeria* var. Fiesta of 15 INTA 60 days after the in vitro culture of meristems.

Tratamientos	N° total	Regeneración (%)	Callo (%)	Mortandad (%)
MS (testigo)	45	0 (0/45) a	0 (0/45) a	67 (30/45) a
MS + 1 mg L ⁻¹ BAP	45	2 (1/45) a	0 (0/45) a	41 (18/45) b
MS + 0,2 mg L ⁻¹ ANA	45	76 (34/45) b	13 (6/45) a	14 (6/45) c
MS + 0,2 mg L ⁻¹ ANA + 1 mg L ⁻¹ BAP	45	22 (10/45) c	2 (1/45) a	33 (15/45) b

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Tukey ($p < 0,05$)
BAP: bencilaminopurina, ANA: ácido naftalenacético.

completas de este cultivar de *Alstroemeria* en los medios que contenían 1 mg L⁻¹ BAP (2) y 1 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA (22%) con respecto al tratamiento conformado por MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA.

Por su parte, no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos en cuanto a la formación de callo, sin embargo, se produjo en los medios de cultivo compuestos por ANA (MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA; y MS + 1 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA), ya que se ha visto que la aplicación de auxinas puede dar origen a esta continua y activa división celular (Jordán y Casaretto, 2006). Por otro lado, el tratamiento MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA obtuvo la menor cantidad de explantes muertos (14%), valor que se diferenció significativamente de los tratamientos restantes por ser del 33 y del 41% en los tratamientos MS + 1 mg L⁻¹ BAP, y MS + 1 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA, respectivamente, y del 67% en el tratamiento testigo. Posiblemente, este alto valor de mortandad se desencadenó a partir de la composición del medio de cultivo ya que, al no tener reguladores de crecimiento, los explantes no lograron adquirir los nutrientes requeridos para optimizar su desarrollo y se necrosaron (Surakshita et al., 2019). En el caso de los tratamientos restantes, los resultados de estas variables pudieron deberse a que la baja producción de raíces impidió la adecuada absorción de los nutrientes proporcionados por los diferentes medios de cultivo y produjo la muerte de los tejidos.

Influencia de BAP y de ANA en la producción aérea y radical de explantes

De acuerdo con el análisis de la varianza, tanto la producción de hojas como la de raíces estuvo ligada a la presencia de reguladores de crecimiento en los tratamientos. La adición de

0,2 mg L⁻¹ de la auxina ANA al medio de cultivo base MS provocó la mayor producción de hojas (3,39) y, consecuentemente, el mayor desarrollo en altura de los explantes (2,40). Distinta fue la reacción al agregar al medio MS 1 mg L⁻¹ de la citoquinina BAP y 0,2 mg L⁻¹ ANA + 1 mg L⁻¹ BAP combinados, ya que en ambos casos se obtuvo una cantidad de hojas (1,59 y 2,06, respectivamente) y una altura aérea significativamente similar (0,70 y 0,89, respectivamente) que no lograron superar a los valores alcanzados por el tratamiento conformado solamente por MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA (Tabla 2 y Fig. 1).

En esta misma tabla también se puede observar que los resultados de longitud radical tuvieron la misma tendencia que la producción aérea, es decir, el tratamiento testigo y aquellos conformados por MS + 1 mg L⁻¹ BAP y MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA + 1 mg. L⁻¹ BAP arrojaron valores de medias significativamente iguales entre sí (0 y 0,3, respectivamente), pero ampliamente inferiores al valor obtenido en el tratamiento compuesto por MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA (1,25), a pesar de haber sido transferidos a un medio de igual composición de auxinas a los 30 días. Los valores alcanzados por el tratamiento conformado por MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA pudieron deberse a que las auxinas son promotoras de la división y la elongación celular, y de la formación de raíces si se las emplea en bajas concentraciones según el requerimiento del material vegetal (Jordán y Casaretto, 2006.) Estos resultados no coinciden con los de Hamidoghli et al. (2007), quienes lograron obtener la mayor proporción de brotes y raíces de *Alstroemeria* cv. Jamaica a partir de la combinación de MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA + 1 mg. L⁻¹ BAP. Por otro lado, tampoco se parecen a los valores expresados por Khaleghi et al. (2008), los cuales alcanzaron la mayor producción aérea y radical de *Alstroemeria*

Tabla 2. Efecto de BAP y de ANA sobre número de hojas, longitud aérea y radical de los explantes de *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA a los 60 días del cultivo in vitro de meristemas.

Table 2. Effect of BAP and ANA on the number of leaves, shoot (aerial) and root (radical) length of explants of *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA at 60 days of in vitro culture of meristems.

Tratamiento	Valor de medias		
	Nº hojas/ explante	Longitud aérea (cm)	Longitud radical (cm)
MS (testigo)	0,44 a	0,08 a	0,00 a
MS + 1 mg L ⁻¹ BAP	1,59 b	0,70 a	0,03 a
MS + 0,2 mg L ⁻¹ ANA	3,39 c	2,40 b	1,25 b
MS + 0,2 mg L ⁻¹ ANA + 1 mg L ⁻¹ BAP	2,06 b	0,89 a	0,30 a

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Tukey ($p < 0,05$)

BAP: bencilaminopurina, ANA: ácido naftalenacético.

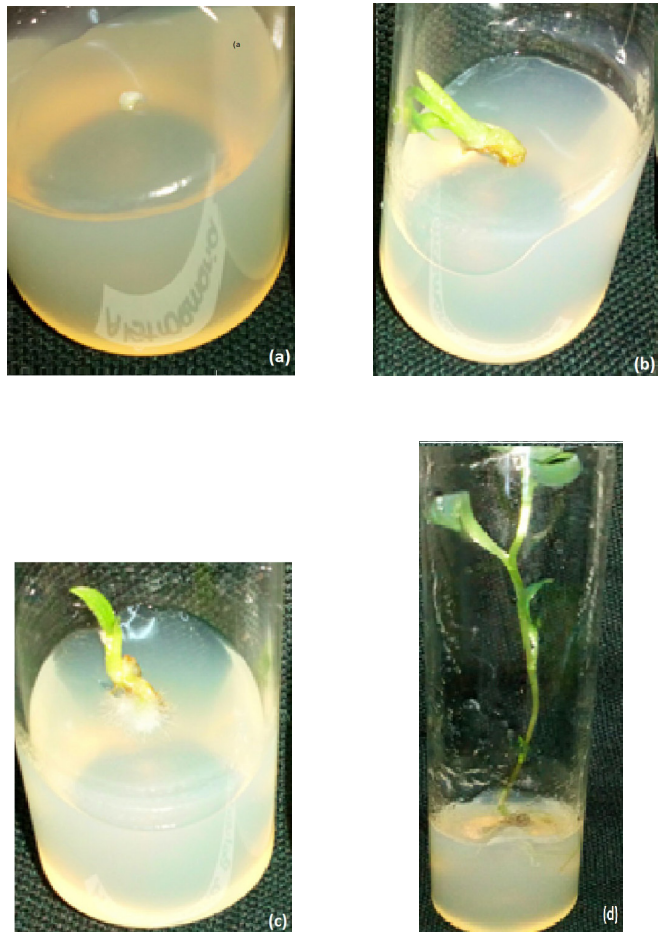


Fig. 1. *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA a los 60 días de cultivo in vitro de meristemas (a) tratamiento testigo; (b) tratamiento MS + 1 mg L⁻¹ BAP; (c) tratamiento MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA + 1 mg L⁻¹ BAP; (d) tratamiento MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA.

BAP: bencilaminopurina; ANA: ácido naftalenacético.

Fig. 1. *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA at 60 days of in vitro culture of meristems (a) control treatment; (b) MS treatment + 1 mg L⁻¹ BAP; (c) MS treatment + 0.2 mg L⁻¹ ANA + 1 mg L⁻¹ BAP; (d) MS treatment + 0.2 mg L⁻¹ ANA.

cv. Fuego con la suplementación de 0,2 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP al medio de cultivo MS. Estas diferencias encontradas pudieron deberse, en primer lugar, a los diversos cultivares de *Alstroemeria* empleados en los experimentos y, por otra parte, a los distintos tipos de explantos utilizados. En ambos casos citados se trataron yemas mientras que en la presente investigación se emplearon meristemas, los cuales respondieron de manera diferente ante las distintas composiciones químicas de los tratamientos. El cultivo de meristemas en un medio adecuado permite obtener plantas completas de manera rápida y genéticamente iguales a la planta madre (Gómez y Rojas, 2017). Además, los meristemas son explantos que permiten menores pérdidas por contaminación, ya que se encuentran menos

expuestos al ambiente por estar cubiertos por primordios foliares.

Sobrevivencia ex vitro de las plántulas de *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA

Finalizado el período de adaptación se vio que de las 28 plantas transferidas al invernadero (aquellas provenientes del medio compuesto por MS + 0,2 mg L⁻¹ ANA y que no poseían callo), 24 sobrevivieron al trasplante, por lo que se obtuvo una sobrevivencia ex vitro del 86%, valor aceptable para la producción de plantas a partir de meristemas (Fig. 2). La muerte de 4 plántulas pudo haber sido producto de su pequeño tamaño al momento de la transferencia del tubo de ensayo a la maceta, el cual no les permitió sobrevivir el período de adaptación.



Fig. 2. *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA.

Fig. 2. *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA.

CONCLUSIÓN

A partir del presente estudio se pudo determinar que la suplementación de 0,2 mg L⁻¹ de la auxina ANA al medio MS es eficiente para el cultivo in vitro de meristemas de rizoma de *Alstroemeria* var. Fiesta de 15 INTA, ya que su empleo posibilita un mayor desarrollo aéreo y radical de los explantes. Por lo tanto, se puede decir que la micropropagación de estas variedades ornamentales provenientes del mejoramiento de recursos genéticos nativos de Argentina, y la obtención de un plantel de plantas madre de mayor calidad, pueden ser apoyadas por la metodología descrita en esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Aros, D., M. Vásquez, C. Rivas, and M. Loreto. 2017. An efficient method for in vitro propagation of *Alstroemeria pallida* Graham rhizomes. *Chilean Journal Agricultural & Animal Sciences* 77(1):95-99.
- Cajas, D., C. Baeza, E. Ruíz, y M. Negritto. 2009. Análisis citogenético en poblaciones de *Alstroemeria hookerilodd* ssp. *Hookeri* (*Alstroemeriaceae*) en la región del Bio-Bio, Chile. *Gayana Botánica* 66(2):117-126.
- Chamorro, A.H., S.L. Martínez, J.C. Fernández, T. Mosquera. 2007. Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium* var. Misty blue. *Agronomía Colombiana* 25(1):47-53.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada. 2009. Grupo Infostat. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gómez, J.D.J., y D.A. Rojas. 2017. Establecimiento del cultivo in vitro de *Gaiadendron punctatum* a partir de yemas y semillas recolectadas en el Cantón Mejía. Trabajo de grado para acceder al título de Ingeniero en biotecnología de los recursos naturales. Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Hamidoghli, Y., S. Bohlooli, and H. Abdollah. 2007. In vitro propagation of *Alstroemeria* using rhizome explants derived in vitro and in pot plants. *African Journal of Biotechnology* 6(18):2147-2149.
- Hassani-Mehraban, A., A.M. Dullemans, and J. Verhoeven. 2019. *Alstroemeria yellow spot virus* (AYSV): a new orthospovirus species within a growing Eurasian clade. *Archives of Virology* 164:117.
- Jordán, M., y J. Casaretto. 2006. Fisiología vegetal. Capítulo XV. Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

- Khaleghi, A., A. Khalighi, M. Sahraroo, A. Karimi, N. Rasoulnia, R. Ghafoori, et al. 2008. In vitro propagation of *Alstroemeria* cv. 'Fuego'. American-Eurasian Journal Agricultural & Environment Science 3(3):492-497.
- Kim, J. 2005. Development of efficient regeneration and transformation systems in *Alstroemeria*. Disponible en <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/44548>. (Accessed 30 May 2019).
- Lin, H., M. De Jeu, and E. Jacobsen. 2000. The application of leafy explant micropropagation protocol in enhancing the multiplication efficiency of *Alstroemeria*. Scientia Horticulturae 85(2000):307-318.
- Murashige, T., and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Pumisutapon, P., R.G.F. Visser, and G.J. de Klerk. 2012. Moderate abiotic stresses increase rhizome growth and outgrowth of axillary buds in *Alstroemeria* cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 110(3):395-400.
- Surakshita, N.C., K. Soorianathasundarama, M. Ganga, and M. Ravendran. 2019. Alleviating shoot tip necrosis during in vitro propagation of grape cv. Red Globe. Scientia Horticulturae 248:118-125.