

## MICROPROPAGACIÓN DE *Gerbera* spp. A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTOS

SEVERIN, C.<sup>1</sup>, GONZALEZ, M.<sup>2</sup> & MURRAY, R.<sup>3</sup>

### RESUMEN

Con el objeto de optimizar la metodología para aumentar la tasa de multiplicación de *Gerbera* spp. y seleccionar el explanto más adecuado para su micropropagación, se utilizaron diferentes explantos: capítulos desarrollados, pedúnculos florales, flores liguladas, primordios de capítulos (5 mm) y ápices de rizomas. Se experimentaron distintos tratamientos de desinfección. El medio de cultivo en el que crecieron y proliferaron los primordios de capítulos y ápices de rizomas fue el de Murashige y Skoog (1962) a la mitad (MS 1/2), aditivos orgánicos MS, 5 mg/L de 6-benciladenina (BA), 0.1 mg/L de ácido indol acético (AIA) y 20 g/L de sacarosa. Se logró el enraizamiento de los brotes en medio MS 1/2, micronutrientes de Heller (1953), 10 mg/L de AIA y 20 g/L de sacarosa: los brotes más vigorosos enraizaron directamente en tierra. De los explantos probados, sólo los ápices de rizomas y los primordios de capítulos prosperaron, la tasa de regeneración fue de 34,2 y 48,3 respectivamente en 21 días de cultivo. Esta técnica constituye una herramienta valiosa para obtener gran número de plantines de una especie que podría ser la alternativa de producción para los floricultores de la región.

*Palabras clave:* *Gerbera* spp., micropropagación, *in vitro*.

### SUMMARY

#### Micropropagation of *Gerbera* spp. from different explants

To improve the methodology for increasing the multiplication rate of *Gerbera* spp. and to select the best explant for its micropropagation, various explants were used: developed capitulum, floral peduncles, ligulate flowers, shoot tips and young capitulum (5 mm). Different treatments of sterilization were experimented. The culture medium where young capitulum and shoot tips grew and multiplied was Murashige and Skoog (1962) at half strength (MS 1/2). MS organic additives, BA 5 mg/L, AIA 0.1 mg/L, and sucrose 20 g/L. The shoots grew roots in MS 1/2

- 
- 1.- Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, C. C. 14 (2123) Zavalla, provincia de Santa Fe, Argentina.
  - 2.- Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.
  - 3.- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), San Pedro, provincia de Buenos Aires, Argentina.
- Manuscrito recibido el 10 de agosto de 1999 y aceptado para su publicación el 6 de diciembre de 1999.

medium with Heller's micronutrients, AIA 10 mg/L and sucrose 20 g/L; the most vigorous shoots grew roots directly in the land. From all the tested explants, only the shoot tips and the young capitulum thrived, the regeneration rate was of 34.2 and 48.3 respectively in 21 days of culture. This technique proves to be a useful tool to obtain a large number of plants from a species that could be the alternative production for the floriculturists of the region.

*Key words:* *Gerbera* spp., micropropagation, *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

La Gerbera es una planta de la familia de las Compuestas de la que se conocen aproximadamente 50 especies distribuidas en África y Asia (Herreros Delgado, 1975). Las Gerberas cultivadas actualmente son híbridos procedentes de *Gerbera jamesonii* Bolus, originaria del Transvaal (África del Sur) en los Drakenberg, a 700 m de altura sobre el nivel del mar. Es una especie que en Europa tiene un gran volumen de comercialización como flor de corte, aunque en nuestro país no está muy difundida. La Gerbera puede multiplicarse por semillas, con la consecuencia de manifestar una gran variabilidad en sus características feno y genotípicas ya que es alógama. La forma ideal de propagación es vegetativa, posible a través de la división de matas, a fin de mantener en la progenie determinadas características como color de flores liguladas, forma de ligulas, ciclo, etc.. La tasa de incremento anual a partir de una planta es de 20 a 40 plantas nuevas utilizando óptima tecnología (Vidalie, 1983). Los antecedentes bibliográficos sobre su propagación *in vitro* indican tasas teóricas de hasta un millón de veces por año a partir de una planta deseada (Murashige *et al.*, 1974). Distintos autores utilizaron diferentes explantos como ápices (Huang & Chu, 1985), capítulos (Pierik *et al.*, 1975; Laliberté *et al.*, 1985), óvulos (Miyoski & Asakura, 1996) u hojas (Jerzy & Lubomski, 1991; Reynoird *et al.*, 1993). El objetivo del presente trabajo fue optimizar la metodología para incrementar la tasa de multiplicación de *Gerbera* spp. y seleccionar el explanto más adecuado para su micropropagación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Debido a que esta especie presenta gran variabilidad en cuanto al tamaño de flor, color, número de flores liguladas, etc. y las variedades comerciales son privativas de las empresas que las producen, gran parte de los autores dan como referencia del material utilizado el color de las flores (Pierik *et al.*, 1975). En nuestro trabajo se emplearon flores de color rojo, rosa y naranja.

Con el fin de seleccionar el explanto más adecuado para su propagación *in vitro*, se utilizaron en su primera etapa 33 capítulos desarrollados, 36 pedúnculos florales y 30 flores liguladas.

Para la obtención de plantas en el caso de los capítulos desarrollados, se separó el escapo floral, se seccionaron las brácteas y se dividieron los capítulos en cuatro partes. Los pedúnculos florales, se prepararon cortándolos longitudinalmente en dos partes de 3 cm de largo cada una. En ambos explantos se probaron diferentes formas de desinfección: la primera se realizó con un pasaje por alcohol al 70 %, 90 minutos en hipoclorito de sodio al 1,5 % más Tween 20 y un enjuague durante 45 minutos en agua destilada estéril; la segunda dejando los explantos 30 minutos en alcohol al 70 %, 15 minutos en hipoclorito de sodio al 2 % más Tween 20 y seguido de 3 enjuagues con agua destilada estéril; la tercera con un pasaje de 30 minutos en hipoclorito de sodio al 2 % más Tween 20, luego 3 enjuagues con agua destilada estéril y un pasaje por ácido cítrico 200 ppm y la cuarta fue semejante a la anterior pero con inmersión previa en alcohol al 70 %.

Como se presentó un alto porcen-

taje de explantos oxidados, se utilizó ácido cítrico como antioxidante.

La metodología utilizada para el caso de las flores liguladas fue diferente, las mismas se cortaron en 3 partes y se realizó la desinfección durante 10 minutos con hipoclorito de sodio al 2 % más Tween 20 y 3 enjuagues con agua destilada estéril.

En todos los casos los explantos se sembraron sobre medio de cultivo con macronutrientes de Murashige y Skoog (1962) a la mitad (MS 1/2), micronutrientes de Heller (1953), 10 mg/L de BA, 0,1 mg/L de AIA, 10 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y el pH se ajustó a 5,6. A este medio base se le introdujo una variante que fue la adición de vitaminas MS, así la mitad de los explantos se sembró con vitaminas y la mitad sin vitaminas. Los cultivos se incubaron dejando una parte de los mismos a oscuridad y otra parte a luz continua en cámara de cultivo durante 4 semanas.

Se probaron nuevos explantos a partir de ápices de rizomas de 7 mm y primordios de capítulos con 5 mm de diámetro.

En este caso, tratándose de explantos sucios se probaron metodologías diferentes para asegurar una mayor asepsia: 1) lavado de las plantas con agua corriente, 15 minutos en hipoclorito de sodio al 2 % más Tween 20 y luego 3 enjuagues con agua destilada estéril; 2) igual que el anterior, con tiempo en hipoclorito de sodio aumentado a 20 minutos y 3) se suspendió el riego de las plantas desde el día anterior y se las pulverizó con fungicida Benomyl al 0,2 % previo a la extracción de ápices y capítulos, incrementándose el tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio a 40 minutos.

Así, los nuevos explantos probados fueron 74 ápices de rizomas y 55 mitades de primordios de capítulos sembrados en medio MS 1/2, con 5 mg/L de BA, 0,1 mg/L de AIA, 20 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar, el pH fue ajustado a 5,6. Los cultivos se mantuvieron con temperaturas de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , alternancia fotoperiódica de 16 horas de luz y

8 de oscuridad y una intensidad lumínica de  $120 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , obteniéndose una respuesta positiva. Con el fin de cumplir el primero de los objetivos propuestos que fue incrementar la tasa de multiplicación, cada 20 días se realizaron subdivisiones de los cultivos y transferencias a medio fresco. Los brotes mayores de 1,5 cm se los transfirió a un medio de enraizamiento conteniendo macronutrientes MS 1/2, micronutrientes de Heller, 10 mg/Ls de AIA y 20 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar, el pH se ajustó a 5,6. Luego de 15 días, los brotes ya enraizados fueron transplantados a macetas con tierra mezclada con acículas de pino, ya que el pH del suelo para esta especie debe ser ligeramente ácido para evitar deficiencia de hierro. Se los aclimató gradualmente en condiciones de invernadero. Los brotes más vigorosos fueron transplantados directamente del medio de cultivo, sin previo pasaje por medio de enraizamiento a bandejas con tierra humifera cubiertas con polietileno transparente y colocadas en cámara de crecimiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los primeros explantos probados (capítulos desarrollados, pedúnculos florales y flores liguladas) no se obtuvo respuesta. El 51 % de los capítulos se contaminó, el 32 % manifestó oxidación y el 18 % murió sin mostrar actividad. De los pedúnculos florales sembrados, el 29 % estuvo contaminado, el 24 % oxidado y el resto permanecieron inactivos. Todas las flores liguladas implantadas aunque permanecieron 15 días intactas en el medio de cultivo, luego se deshidrataron y murieron. En el caso de capítulos y pedúnculos, a pesar de solucionarse el problema de oxidación mediante el agregado de ácido cítrico, no se obtuvo regeneración.

En cuanto al resto de los explantos probados, se comprobó que el 100 % de los ápices de rizomas y de los primordios de capítulos tratados con las dos primeras formas

Cuadro 1: Número de explantos sembrados, porcentaje de contaminados, sobrevivientes, proliferantes y tasa de proliferación *in vitro* de primordios de capítulos y ápices de rizomas de *Gerbera* spp.

Explantos	Nº individuos sembrados	% individuos contaminados	% individuos sobrevivientes	% individuos proliferantes	Tasa de proliferación*
Primordios de capítulos	55	67	33	33	48,3
Ápices rizomas	74	90	9	9	34,2

\* Número promedio de brotes por explanto en 21 días de cultivo.

de desinfección, estuvieron contaminados. Con la tercera forma de desinfección (pulverización con fungicida y 40 minutos en hipoclorito de sodio al 2%) se obtuvo un 9 % de ápices de rizomas y un 32,7 % de trozos de pimpollos libres de contaminación (Cuadro 1). La contaminación de los ápices de rizomas es atribuible a la extremada pubescencia de los mismos (Murashige *et al.*, 1974) y al contacto con el suelo.

El 100 % de los explantos (ápices de rizomas y primordios de capítulos) no contaminados crecieron y proliferaron y no hubo formación de callos, lo que sería indeseable, a diferencia de lo que informaron Laliberté *et al.* (1985) utilizando los cultivares Pastourelle y Mardi Grass en otro medio de cultivo. A los 15 días desde la siembra *in vitro* se observaron masas de brotes, algunos de los cuáles después de 20 días de la implantación de los cultivos presentaron 3 hojas, la mayor de 2 cm de longitud. La tasa de regeneración de brotes determinada para un periodo de 21 días resultó de 34,2 brotes para ápices de rizomas, si bien la tasa de contaminación a la siembra de estos explantos fue alta, la proliferación de los mismos superó a lo obtenido por otros autores como Huang y Chu (1985), que informaron 10 brotes por explanto al cabo de 4 semanas de cultivo.

Para primordios de capítulos, la tasa de proliferación fue de 48,3 en 21 días, en ambos casos los brotes fueron normales. Laliberté *et al.* (1985) obtuvieron con capítulos jóvenes un promedio de 4 brotes cada 4 semanas, mientras que Jerzi & Lubomsky (1991) a partir de hojas lograron 6 brotes por explanto. En ambos trabajos, con 5 mg/L de BA en el medio de cultivo, se informa sobre la presencia de brotes con hojas anormales en el primer caso y brotes vitrificados en el segundo, no habiéndose presentado dichas manifestaciones en nuestro trabajo. Reynoird *et al.* (1993) obtuvieron 5 brotes por explanto de hoja en un periodo de 2 meses. Pierik *et al.* (1975) obtuvieron formación de brotes (8 a 12 en 8 semanas) mediante un periodo de oscuridad de 4 semanas, en nuestro caso la tasa de proliferación fue alta con fotoperiodo de 16 horas durante todo el cultivo.

Los brotes obtenidos de primordios de capítulos y de ápices de rizomas se transfirieron luego de 90 días desde la siembra *in vitro* a medio de enraizamiento, donde el 100 % de los mismos diferenció raíces.

Se obtuvo un 80 % de éxito en el enraizamiento de los vástagos jóvenes llevados directamente a macetas con tierra sin pasar por medio de enraizamiento. Al llevar los minibrotes directamente a tierra, ajustando los parámetros ambientales, es factible

lograr un eficiente enraizamiento y acelerar la rusticación. Huang y Chu (1985), lograron el enraizamiento del 40 % de los brotes de 1 a 2 cm de longitud y de un 90 % de los brotes de 2 a 4 cm, tratados en ambos casos con ácido indol butírico (IBA) y bajo niebla.

El tiempo total transcurrido desde la implantación del explanto *in vitro* (ápices de rizomas y primordios de capítulos), hasta lograr plantas en tierra fue de 120 días. El pasaje a tierra podría lograrse en menor tiempo, pero se priorizó la obtención de mayor número de brotes, por lo que se mantuvo mayor tiempo *in vitro* para estimular con sucesivas divisiones la proliferación del material. Las plantas obtenidas crecieron normalmente, florecieron y no manifestaron variaciones fenotípicas en relación a las plantas de las que se obtuvieron los explantos.

Tanto los ápices de rizomas como los primordios fueron explantos exitosos para la propagación *in vitro* de *Gerbera* spp. por su proliferación y obtención de plantas normales, la diferencia entre ambos puede establecerse a partir de la mayor facilidad de desinfección de los primordios de capítulos, ya que el 90 % de los ápices de rizomas resultaron en explantos contaminados y el 33 % de los primordios de capítulos sobrevivieron.

La factibilidad de esta técnica, dada por su sencillez y eficacia la hace una herramienta válida para la obtención de gran número de plantines de una especie que podría ser la alternativa de producción para los floricultores de la región.

## BIBLIOGRAFÍA

- HERREROS DELGADO, L. M.** 1975. Multiplicación de la gerbera. Hojas Divulgadoras. Ministerio de Agricultura. Madrid. España. 22-75 HD: 1-12.
- HUANG, M. C. & CH. CHU.** 1985. A scheme for commercial multiplication of *Gerbera* (*Gerbera hybrida* Hort.) through shoot tip cultures. J. Japan Soc. Hort. Sci. 54: 94-100.
- JERZY, M. & M. LUBOMSKI.** 1991. Adventitious shoot formation on *in vitro* derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. Scientia Horticulturae 47: 115-124.
- LALIBERTÉ, S.; L. CHRÉTIEN & J. VIETH.** 1985. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. HortScience 20: 137-139.
- MIYOSHI, K. & N. ASAKURA.** 1996. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of *Gerbera* (*Gerbera jamesonii*). Plant Cell Reports 16: 1-5.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- MURASHIGE, T.; M. SERPA & J. B. JONES.** 1974. Clonal multiplication of *Gerbera* through tissue culture. HortSc. 9: 175-180.
- PIERIK, R. L.M.; J. L. M. JANSEN; A. MAASDAN & C. B. BINNEN DIJK.** 1975. Optimization of *Gerbera* plantlet production from excised capitulum explants. Sci. Horticulturae 3: 251-357.
- REYNOIRD, J. P.; D. CHRIQUI; M. NOIN; S. BROWN & D. MARIE** 1993. Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 203-210.
- VIDALIE, H.** 1983. Producción de flores y plantas ornamentales. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 263 pp.