

ESTABLECIMIENTO Y MICROPROPAGACIÓN DE FRESA (*FRAGARIA X ANANASSA* DUCH.) EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT)

Cuazitl Flores María Fernanda (1), Núñez Palenius Héctor Gordon(2)

1 [Ingeniería agroindustrial, Universidad Politécnica de Chiapas] | [fernanda.cuazitl@hotmail.com]

2 [Departamento de agronomía, División ciencias de la vida, Campus Irapuato – Salamanca, Universidad de Guanajuato]
| [palenius@ugto.mx]

Resumen

El uso de un sistema de inmersión temporal para la micro propagación de especies vegetales es una técnica que permite que las plántulas tengan un mayor crecimiento, el cual se mide por la aparición de nuevos brotes. Aplicar esta tecnología en el cultivo de la fresa ayuda a tener plántulas libres de agentes contaminantes como bacterias y hongos y un mejor desarrollo de la planta. Por ello el objetivo de este trabajo fue el de evaluar el crecimiento de dos variedades de *Fragaria x ananassa*, variedad Douglas y Carlsbad, en biorreactores con dos tipos de reguladores de crecimiento vegetal, thidiazuron y ácido indolbutírico, a diferentes concentraciones. Con 7 inmersiones al día de 10 segundos, cada hora y media. Se evaluó la cantidad de raíces, hojas nuevas y hojas necrosadas. Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento 3 bajo la concentración de IBA a 0.3mg/L, produciendo 22 raíces nuevas en total y 15 hojas nuevas. Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico *Infostat*®.

Abstract

The use of an immersion temporary system in plant micropropagation is a technique that allows a better and higher plant growth, which is measured by the production of new shoots. Applying this technology in strawberries crops helps having healthy plants, free from bacteria and fungi. In the present work it was evaluated the growth of two *Fragaria x ananassa* variety, Douglas and Carlsbad, in bioreactors with two types of vegetal growth regulators, thidiazuron and indolbutiric acid at different concentrations. With 7 immersion per 10 seconds at day, every hour and half. It was evaluated the number of new shoots of roots and leaves, also necrotic leaves. The best results were obtained with treatment number 3, IBA at 0.3m/L, producing 22 roots shoots and 15 new leaves. Data obtained was analyzed with *Infostat*®.

Palabras clave

Micropropagación; sistema de inmersión temporal; reguladores de crecimiento; *Fragaria x ananassa*; biorreactores.

INTRODUCCIÓN

Fragaria x ananassa

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es el resultado de la hibridación de *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis*. [1]. Es cultivada en casi todo el mundo, no solamente por sus características digestivas y tónicas, sino por el valor nutritivo de sus frutos, fuente importante de folato, vitamina C, fibra, potasio, flavonoides, antocianidina, fitoquímicos y antioxidantes [2], además de sus múltiples usos entre los que se encuentran su exportación e importación como producto fresco, en la industria alimenticia y como saborizante[3]. por ello se considera que el cultivo de la fresa es de importancia económica, sin embargo su cultivo presenta diversos problemas debido a que el fruto presenta un genoma poliploide, complicando así la producción de nuevas plantas [4].

Micropropagación vegetal.

La micropropagación es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la producción masiva de plantas con gran valor comercial [5]. Entre las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, la micropropagación de plantas a través de la organogénesis ha beneficiado sustancialmente las industrias hortícolas, agrícolas y forestales [6].

- *Sistemas de inmersión temporal (SIT).*

Los sistemas de inmersión temporal consisten en la inmersión del tejido vegetal a intervalos regulares de tiempo y, en general, proporcionan una mayor tasa de multiplicación, reduciendo la necesidad de manipular los explantes y el uso de medio de cultivo líquido, lo cual permite reducir los costos de producción de las plántulas [7]. Los efectos positivos del SIT en la micropropagación están indicados por la proliferación de brotes, aparición de callos y embriogénesis somática. (8). La aplicación de la micropropagación in vitro depende de la combinación correcta de hormonas

exógenas (auxinas y citosinas) agregadas al medio [9].

Aplicar este sistema en el cultivo de la fresa permitirá que la propagación sea más accesible y segura. Así que no solo se pretende demostrar la eficacia de un SIT, sino también encontrar la mejor concentración de reguladores de crecimiento para la fresa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en las instalaciones del laboratorio de tejido vegetal de la universidad de Guanajuato ubicado en Ex-Hacienda del Copal, en el estado de Guanajuato.

- *Obtención de plántulas.*

Se utilizaron dos variedades, Douglas y Carlsbad. Ambas plántulas se encontraban en un medio de cultivo semi-sólido Murashige & Skoog (M.S.1962). Las plántulas fueron donadas por la Doctora Alba Jofre del Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) unidad Irapuato.

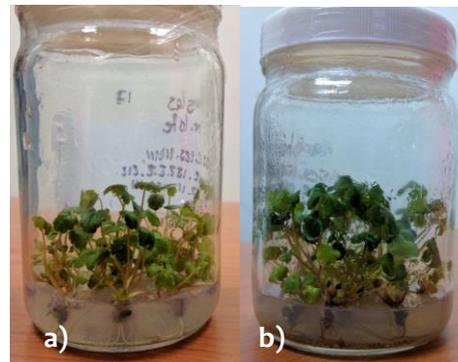


Figura 1. Plántulas de fresa en medio semi-sólido a) variedad Douglas y b) variedad Carlsbad.

- *Preparación de medio Murashige & Skoog (1962).*

Se preparó un litro y medio de solución de cultivo al 50%. Se pesaron 6.6 gramos de medio Murashige & Skoog (1962), se agregaron 22.5 gramos de sacarosa. Los reguladores de crecimiento a utilizar fueron thidiazuron (TDZ) y ácido indolbutírico (IBA) en diferentes

concentraciones tabla 1. Una vez que se agregaron los reguladores de crecimiento se midió y ajusto el pH a 5.7 - 5.8. Se vertieron 50 mL de medio en cada uno de los 24 biorreactores, a los cuales previamente se les introdujo una maya de plástico, con la finalidad de evitar el contacto de la plántula con el medio líquido. Se esterilizaron los biorreactores con el medio en la autoclave a una temperatura de 120°C a 1.5 psi por 20 min.

Tabla 1: Relación entre la concentración del regulador vegetal y su respectivo tratamiento para ambas variedades.

Distribución de reguladores de crecimiento vegetal				
	T1	T2	T3	T4
Variedad Douglas	TDZ 0.5mg/L	TDZ 0.1mg/L	IBA 0.15mg/L	IBA 0.3mg/L
Variedad Carlsbad	TDZ 0.5mg/L	TDZ 0.1mg/L	IBA 0.15mg/L	IBA 0.3mg/L

Preparación de biorreactores con material vegetal.

Con la ayuda de unas pinzas, se tomó cada plántula, se cortaron raíces y otras partes necrosadas. Una vez limpias, se introdujeron en su respectivo biorreactor y se sellaron. Posteriormente se llevaron al cuarto de crecimiento. En el cual se sometieron a 7 inmersiones de 10 segundos cada una al día, cada hora y media.



Figura 2. Las plántulas de fresa se limpiaron y colocaron en biorreactores, todo bajo condiciones estériles

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables a considerar para determinar los resultados fueron: brotes nuevos de raíces y hojas, así como hojas necrosadas. Se realizó un diseño de experimento aleatorio unifactorial, en el cual se evaluó la relación de los reguladores de crecimiento TDZ e IBA. Cada uno a dos concentraciones y 6 repeticiones respectivamente.

- *Análisis estadístico*

Se realizó un análisis de varianza y una prueba de Fisher con un nivel de significancia del 5% para cada variable respuesta. En las tablas 3, 4 y 5 se presentan los resultados de los análisis de varianza. Se puede observar que los tratamientos con IBA produjeron mejores resultados es cuanto a producción de raíces.

Tabla 2. Resultados obtenidos del ANOVA para numero de raíces nuevas. Los tratamientos 3 y 4 dieron mayor número de raíces.

Raíces nuevas.					
tratamientos	Medias	n	E.E.	DMS Fisher	
3	5.33	6	0.52	A	
4	4.17	6	0.52	A	
1	2.67	6	0.52	A	B
2	2.67	6	0.52		B

En cuanto a hojas nuevas, el tratamiento 1 (TDZ a 0.5mg/L) dio mayor número de hojas, seguido por el tratamiento 3 (IBA a 0.15mg/L). Estadísticamente no hay diferencia significativa entre los tratamientos

Tabla 4. Las hojas necrosadas representan el daño que los tratamientos llegan a causar en las plántulas. La incidencia de hojas necrosadas fue de 0 a 3 hojas.

Tabla 3. Resultados del ANOVA para hojas nuevas. El mayor número de hojas fue de 16, en el tratamiento 1

Hojas necrosadas					
Tratamientos	Medias	n	E.E.	DMS Fisher	
1	0.50	6	0.26	A	
2	0.33	6	0.26	A	
4	0.33	6	0.26	A	
3	0.00	6	0.26	A	

El daño causado por los tratamientos a los explantes se midió por el total de las hojas necrosadas. El tratamiento 1 presentó mayor número de hojas necrosadas, 3 en total. Estadísticamente no hay diferencia entre los tratamientos.

CONCLUSIONES

Los mejores tratamientos para la producción de raíces nuevas son el 3 y el 4, que representan las concentraciones de IBA a 0.15mg/L y 0.3mg/L respectivamente, mientras que los tratamientos con TDZ produjeron el mismo de raíces entre sí, por lo tanto no se encontró relevancia estadística.

Para la producción de hojas nuevas los tratamientos 1 y 3, demostraron ser mejores.

De acuerdo a los análisis estadísticos realizados, la concentración correspondiente al tratamiento 3 es la mejor opción para ser aplicado en un SIT si lo que se desea es inducir el crecimiento de raíces. Entre los reguladores de crecimiento vegetal, IBA y TDZ, IBA dio mejores resultados, al ser el regulador de crecimiento que menos hojas necrosadas presenta y mayor número de hojas y raíces en total.

Hojas nuevas					
Tratamientos	Medias	n	E.E.	DMS Fisher	
1	2.67	6	0.43	A	
3	2.50	6	0.43	a)	A
2	2.33	6	0.43	A	
4	2.00	6	0.43	A	

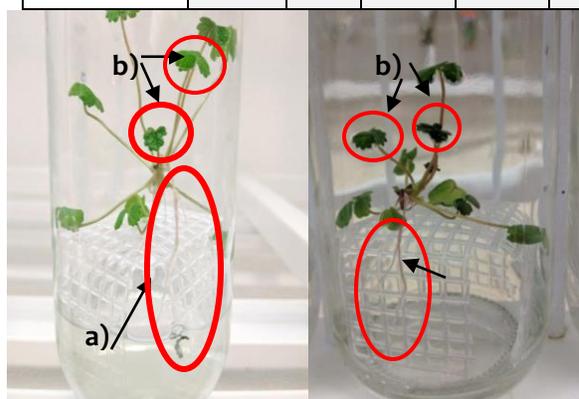


Figura 3. Biorreactor con plántula de fresa. a) raíces b) hojas nuevas

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Héctor Gordon Núñez Palenius, Rebeca Ramírez Aguilar, Claudio Bernardo Padilla González, la Dra. Alba Jofre, Cedma Chocoteco, Eugenia Altúzar. Que sin su ayuda y apoyo este trabajo de investigación no hubiera sido posible, Gracias.

REFERENCIAS

- [1] Bhatia, S. (2015) Micropropagation. En Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical science (pp.). Oxford : Elsevier.
- [2]. Etienne, H. & Berthouly, M. (2002). *Temporary immersion systems in plant micropropagation*. Plant cell, tissue and organ culture, 112 (215).

- [3] Jain, S.M. & Nakhooda, M. (2017) Clonal and Micropropagation. En *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (pp. 428-432). Editorial Elsevier.
- [4] Welandera, M., Perssona, J. & Aspb, H. (2014) *Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation*. *Scientia Horticulturae*, 179, 227-232. doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.035
- [5] Scherera, R., Correa, A., et al. (2013) Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, 151, 38-45. doi: 10.1016/j.scienta.2012.11.027
- [6] Lim, T.K. (2012). *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Nueva Delhi, Springer Netherlands.
- [7] Hanhineva, K., & Kärenlampi, S. (2007) Production of transgenic strawberries by temporary immersion bioreactor system and verification by TAIL-PCR. *BMC Biotechnology*, 7(2), 38-46. doi:10.1186/1472-6750-7-11
- [8] Sanchez, C. & Salaverría, J. L. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa. *Revista UDO agrícola* 4(1), 21-26. 1.
- [9] Kessel, A. (2012). Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 34-41. Recuperado en 14 de julio de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362012000300005&lng=es&tng=es.