

Efecto de los reguladores del crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *Dieffenbachia picta*.

In vitro propagation of *Dieffenbachia picta* as affected by growth regulators.

Autoras: M Sc. Yulien Miguélez-Sierra¹, M Sc. Laura Rodríguez-Dallas²

Organismo: Universidad de Guantánamo, Carretera a Santiago de Cuba, Km. 2½, Guantánamo, Cuba¹. Universidad de La Habana. MES, La Habana, Cuba².

E-mail: yulien@fam.cug.co.cu¹

Resumen.

Dieffenbachia picta es una aráceas ornamental de follaje con alto valor comercial. La micropropagación se considera una vía para la multiplicación rápida, uniforme y sana de estas plantas. Con el objetivo de lograr una adecuada propagación *in vitro* de la especie se evaluó la influencia de algunos reguladores del crecimiento como el 2-isopentiladenina (2ip), el ácido indol-3-ácetico (AIA), tiazuron (TDZ), paclobutrazol (PBZ) y la benzilaminopurina (BAP) en la fase de multiplicación. Se utilizaron brotes establecidos a partir de yemas axilares inactivas y durante varios subcultivos se determinó el número de brotes y el coeficiente de multiplicación por explante. Se obtuvieron brotes vigorosos y con raíces, aptos para la transferencia directa a condiciones *ex vitro*.

Palabras clave: citoquininas; *Dieffenbachia picta*; propagación *in Vitro*; yemas axilares.

Abstract.

Dieffenbachia picta is an ornamental aroid of foliage with high commercial value. In order to achieving a successful *in vitro* propagation, some growth regulators such as 2ip, IAA, TDZ, PBZ and BAP were evaluated in the multiplication phase. Shoots obtained from inactive axillary buds were used as explants. The number of shoots and multiplication rate were determined in different subcultures. As result of the propagation process vigorous rooted shoots were obtained ready to be transferred to *ex vitro* conditions.

Keywords: cytoquinin; *Dieffenbachia picta*; *in vitro* propagation; axillary buds.

Introducción.

En la familia Araceae se destaca el género *Dieffenbachia* al cual pertenecen especies de gran valor ornamental por la belleza de su follaje, en especial, *D. picta* cv. 'Exotica', 'Camille', 'Marianna' y *D. amoena* cv. 'Tropi Snow'. Estas plantas se propagan comercialmente y ocupan lugares importantes en la industria de plantas ornamentales (Matsumoto y Kuehnle, 1997; Conover, 1998).

En los inicios de su propagación comercial, el género fue afectado por virus, hongos y bacterias sistémicas causantes de enfermedades en las plantaciones que conllevaron a considerables pérdidas económicas. Este hecho propició la aplicación de las técnicas biotecnológicas para el saneamiento y multiplicación rápida de este tipo de plantas.

Entre las dieffenbachias que tienen demanda en Cuba se encuentra *D. picta* cuya disponibilidad de plantas es muy reducida de forma que la propagación se realiza a pequeña escala mediante la propagación por esquejes. La alternativa de micropropagar en estas plantas brinda la posibilidad de aprovechar eficientemente el potencial de cada una, con multiplicación a mayor escala que permite disponer de plantas con gran uniformidad y calidad sanitaria.

Existen algunos trabajos con éxito en la micropropagación de varias especies y cultivares del género *Dieffenbachia*. En ellos se señala el cultivo de ápices y yemas axilares de reducido tamaño para inducir brotes múltiples (Voyiatzi y Voyiatzis, 1989; Maity *et al.*, 1994).

En el presente trabajo se estudió la influencia de algunos reguladores del crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *Dieffenbachia picta* como etapa fundamental en el proceso de micropropagación de esta especie.

Desarrollo.

Materiales y métodos

Se utilizaron plantas de *Dieffenbachia picta* Schott mantenidas bajo condiciones semicontroladas en casa de cultivo. El medio de cultivo base para todos los experimentos estuvo compuesto por las sales Murashige and Skoog (1962), mio-inositol (100 mg/l), tiamina (0,4 mg/l), ácido nicotínico (0,5 mg/l), piridoxina HCL (0,5 mg/l), glicina (2 mg/l), sacarosa (30 g/l) y agar (7 g/l) según Knauss (1976). Los cultivos se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, iluminación de 3000 lux ($37,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

En los experimentos se utilizaron como explantes, brotes establecidos a partir de yemas axilares inactivas a los cuales se les realizó un test según Borrás *et al.* (1996) para detectar contaminación endógena. El procedimiento de decapitación se aplicó antes del segundo subcultivo en todos los casos. Se colocaron cinco explantes por recipiente de cultivo con 25 ml de medio. Los recipientes utilizados fueron frascos de cristal de 350 ml de capacidad y con tapa metálica. Los subcultivos y evaluaciones se realizaron cada 30 días. Se evaluó el número de brotes por explante y estos se seccionaron para determinar el coeficiente de multiplicación. Se emplearon 25 explantes por tratamiento en todos los experimentos.

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Plus versión 2.1. Se utilizó la prueba LSD (Mínima diferencia significativa) para la comparación múltiple de medias con $p \leq 0.05$.

Se evaluaron cuatro concentraciones de 2ip (0, 8, 16 y 24 mg/l) combinadas con AIA (0 y 2 mg/l). El diseño experimental fue completamente aleatorizado con arreglo bifactorial.

Efecto de las combinaciones de TDZ y 2ip en la proliferación axilar de brotes.

Se evaluaron tres concentraciones de TDZ (0, 0,5 y 1 mg/l) y sus combinaciones con el 2ip (0, 8 y 16 mg/l) mediante un experimento de diseño completamente aleatorizado con arreglo bifactorial. El medio de cultivo base contenía AIA (2 mg/l).

Resultados y discusión

Evaluación del efecto de las combinaciones del 2ip y el AIA en la inducción de brotes axilares.

La tabla I muestra el número de brotes inducidos por las combinaciones de 2ip y AIA en cuatro subcultivos, dado que las interacciones presentan un efecto significativo en el análisis factorial.

Tabla I. Número de brotes axilares inducidos por la interacción 2iP-AIA.

Combinación (mg/L)					
2iP	AIA	1	2	3	4
0	0	0.06 bc	0.26 d	1.40 a	1.47 a
0	2	0 c	0.20 d	0.66 b	0.86 b
8	0	0.20 bc	1.66 c	1.36 a	1.36 a
8	2	0.13 bc	1.53 c	1.26 a	1.26 ab
16	0	0.46 ab	2.40 b	1.60 a	1.53 a
16	2	0.86 a	3.20 a	1.50 a	1.36 a
24	0	0.40 bc	2.26 c	1.46 a	1.31ab
24	2	0.46 ab	2.33 b	1.29 a	1.29 ab
ES X (\pm)		0.20*	0.11*	0.21*	0.24*

* Medias con letras iguales no difieren significativamente ($p < 0.05$; LSD).

La respuesta en el primer subcultivo fue una baja proliferación de brotes. El mayor número de brotes se obtiene en las concentraciones de 16 y 24 mg/l de 2ip solo o combinado con AIA, difiriendo significativamente de los demás tratamientos, con un máximo de 0,86 en la combinación 16 mg/l de 2ip más 2 mg/l de AIA. La pobre brotación se debió a la fuerte dominancia apical que ejerce el ápice sobre las yemas laterales. La decapitación de los explantes permitió que en el segundo subcultivo aumentara el número de brotes de forma que el tratamiento 16 mg/l de 2ip más 2 mg/l de AIA presentó nuevamente el mayor número de brotes con 3.2 por explante y un coeficiente de multiplicación de 2.8, lo cual difirió significativamente de los demás tratamientos y fue secundada por el resto de los tratamientos que contenían 16 y 24 mg/l de 2ip (Tablas I y II).

Los resultados del segundo subcultivo muestran que un incremento de 2ip más allá de 16 mg /l no incrementan significativamente el número de brotes y que niveles menores de esta citoquinina no son suficientes para una adecuada inducción, así se confirma el resultado

encontrado en la literatura sobre el empleo de 16 mg/l de 2ip en la multiplicación de la especie (Knauss, 1976; Taylor y Knauss, 1978; Voyiatzi y Voyiatzis, 1989).

En el tercer y cuarto subcultivo la proliferación de nuevos brotes axilares se redujo (tabla 1) y como consecuencia los coeficientes de multiplicación fueron bajos (tabla II). La respuesta de los brotes fue principalmente el crecimiento en tamaño, número de hojas y raíces. El hecho de que la brotación obtenida proviene de las yemas axilares preexistentes explica la reducción en el número de brotes después de dos subcultivos debido a que la mayoría de las yemas crecieron. Estos resultados son similares a los obtenidos por Voyiatzi y Voyiatzis (1989) con el cultivar 'Mariana' de *Dieffenbachia exotica* para el cual la combinación de 16 mg/l de 2ip más 2 mg/l de AIA indujo el mayor número de brotes en el tercer subcultivo y se presentó una disminución drástica en el cuarto subcultivo hasta un valor cercano a cero. Por otra parte, Maity *et al.* (1994) al establecer *D. picta* 'Exotica' realizaron sólo dos subcultivos en la multiplicación.

Tabla II. Coeficientes de multiplicación obtenidos con la interacción 2iP-AIA.

Combinación (mg/L)				
2iP	AIA	2	3	4
0	0	1.0 d	1.10 b	1.05
0	2	1.0 d	1.0 b	1.0
8	0	1.26 cd	1.0 b	1.15
8	2	1.13 d	1.0 b	1.21
16	0	1.73 bc	1.10 b	1.18
16	2	2.80 a	1.33 a	1.10
24	0	1.66 bc	1.11 b	1.10
24	2	1.80 bc	1.0 b	1.0
ES X (±)		0.27*	0.09*	0.17 ns

Efecto de las combinaciones de TDZ y 2ip en la proliferación axilar de brotes.

La tabla III muestra el número de brotes inducidos por las combinaciones de 2ip y TDZ en tres subcultivos dado que la interacción entre estas citoquininas resultó significativa en el análisis factorial de los datos. En el primer subcultivo el número de brotes fue bajo en todos los tratamientos. Esto se debió a la dominancia del ápice que no pudo ser superada por el TDZ ni sus combinaciones con 2ip.

Tabla III. Número de brotes axilares inducidos por la interacción 2iP-TDZ.

Combinaciones (mg/L)		Número de subcultivos		
2iP	TDZ	1	2	3
0	0	0 c	0.16 c	0.66 c
0	0.5	0.33 bc	1.73 b	1.20 b
0	1	0.46 abc	2.20 ab	1.31 ab
8	0	0.50 ab	1.83 b	1.37 a
8	0.5	0.46 abc	2.0 b	1.50 a
8	1	0.66 ab	2.0 b	1.18 b
16	0	0.66 ab	3.16 a	1.38 a
16	0.5	0.50 ab	2.66 ab	1.40 a
16	1	0.46 abc	1.66 b	1.22 b
ES X (±)		0.25*	0.52*	0.18*

* Medias con letras iguales no difieren significativamente (p<0.05).

En ausencia de citoquininas no hubo desarrollo de brotes. En el segundo subcultivo se obtuvo un incremento del número de brotes hasta 3.16 con 16 mg/l de 2ip. Otros dos tratamientos presentaron una respuesta similar pero no llegaron a tres brotes por explante, estos fueron la combinación de 2ip (16 mg/l) más TDZ (0,5 mg/l) y el TDZ solo a 1 mg/l. En los tratamientos con TDZ los brotes presentaron un engrosamiento del tallo no observado en ausencia de esta citoquinina lo cual no permitió un desarrollo adecuado de los mismos. Efectos similares del TDZ han sido observados en *Cattleya mossiae* Parker ex Hook con concentraciones de TDZ por encima de 1 µM/L (Torres y Mogollón, 2000).

En cuanto al coeficiente de multiplicación, los tratamientos con 16 mg/l de 2ip y la combinación de este con TDZ (0,5 mg/l) fueron superiores de forma que el TDZ solo no superó los resultados del 2ip en este parámetro (tabla IV). En el tercer subcultivo se presentó una disminución notable del número de brotes y del coeficiente de multiplicación en todos los tratamientos.

El TDZ ha sido usado por su potente acción en la organogénesis, en concentraciones más bajas que el resto de las citoquininas (Fontana *et al.*, 2009). Se ha obtenido buenos resultados con el mismo rango de TDZ usado en este experimento en la propagación *in vitro* de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) donde la combinación de TDZ (0.5 ó 0.75 mg L⁻¹) con BAP (1.0 mg L⁻¹) e IBA (1.0 mg L⁻¹) incrementó la tasa de multiplicación y aceleró la ruptura de la dormancia de las yemas según Garriga (2010). El TDZ se ha empleado en la multiplicación de varias especies, solo y en combinación con el BAP, 2ip y kinetina, en cultivos como *Limonium* var. Misty blue (Chamorro *et al.*, 2007), *Toona ciliata* (Daquinta *et al.*, 2005) y *Arachis correntina* (Leguminosae) (Mroginski *et al.*, 2004).

Tabla IV. Coeficientes de multiplicación obtenidos con la interacción 2iP-TDZ.

Combinaciones (mg/L)		Número de subcultivos	
2iP	TDZ	2	3
0	0	1.0 b	1.0
0	0.5	1.33 b	1.10
0	1	1.60 ab	1.20
8	0	1.66 ab	1.08
8	0.5	1.33 b	1.21
8	1	1.66 ab	1.06
16	0	2.66 a	1.37
16	0.5	2.33 a	1.41
16	1	1.46 b	1.0
ES X (±)		0.30*	0.26 ns

* Medias con letras iguales no difieren significativamente (p<0.05).

Evaluación del efecto del PBZ en la inducción de brotes axilares.

En la Figura 1 se observa el número de brotes inducido por los diferentes tratamientos en cuatro subcultivos. Inicialmente, no hay diferencias significativas y los valores son bajos.

Después de la decapitación, en el segundo subcultivo aumentó el número de brotes en todos los tratamientos con la media mayor para el tratamiento sin PBZ que presentó 3,33 brotes por explante y difirió significativamente de los tratamientos con PBZ. Sin embargo, en el tercer subcultivo los tratamientos con PBZ indujeron mayor número de brotes debido a que los explantes permanecieron en medios sin PBZ durante el segundo subcultivo y esto contribuyó al crecimiento de los brotes en el tercer subcultivo.

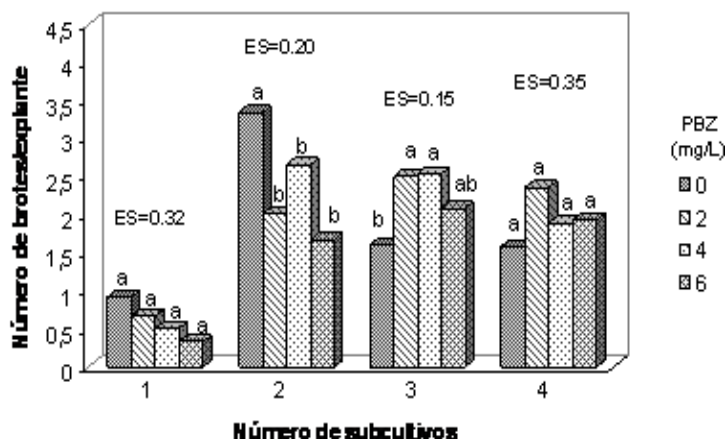


Figura. 1. Influencia de diferentes concentraciones de PBZ en el número de brotes axilares. Medias con letras iguales no difieren significativamente ($p < 0.05$).

Al analizar el coeficiente de multiplicación (figura 2), se observa que con el 2ip más AIA se obtiene un valor muy superior en el segundo subcultivo lo cual se debe a que en los otros tratamientos el PBZ indujo una marcada reducción del tamaño de los brotes. Esta respuesta minimiza la aparente ventaja que presentan los tratamientos con PBZ en el número de brotes durante el tercer subcultivo.

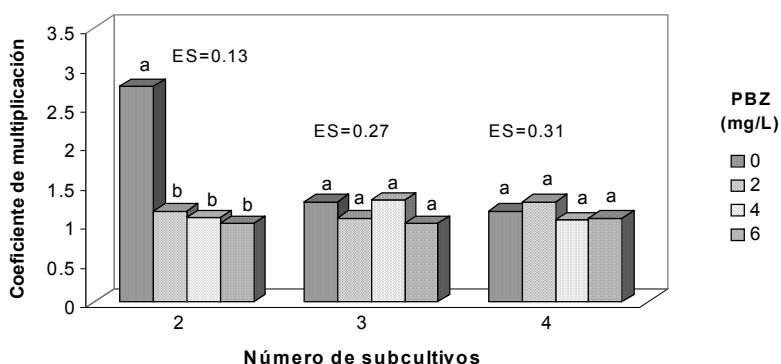


Figura. 2. Influencia de diferentes concentraciones de PBZ en el coeficiente de multiplicación. Medias con letras iguales no difieren significativamente

Las concentraciones de PBZ evaluadas en este experimento se encuentran dentro del rango que se ha empleado en las aráceas. Werbrouck y Debergh (1996) obtuvieron un elevado número de brotes al cultivar yemas de *Spathiphyllum floribundum* y *Anthurium andraeanum* con una combinación de BAP (2.25 mg/l) y PBZ (2,93 mg/l). El uso de PBZ ha tenido éxito en la multiplicación de otras especies como *Solanum tuberosum* ($29,10^{-5}$ mg/l) aplicado a las plantas donadoras de explantes, en la piña var. Cayena Lisa de México (0,5 mg/l) y var. Cayena lisa Serrana (10 mg/l), en la multiplicación de banano FHIA-18, de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) (Daquinta, et al., 2001; Chacón et al., 2005).

Conclusiones.

Al evaluar el efecto del 2ip y sus combinaciones con AIA se obtuvo que el tratamiento de 16 mg/l de 2ip con 2 mg/l de AIA alcanzó el mayor número de brotes y el mayor coeficiente de multiplicación, con valores satisfactorios para la fase de multiplicación de 3,2 y 2,8, respectivamente.

El TDZ no resultó superior al 2ip en la inducción de brotes a las concentraciones evaluadas ya que ninguna de ellas alcanzó 3 brotes por explante.

La adición del PBZ al medio de cultivo que contenía 2ip (16 mg/l) y el AIA (2mg/l) no resultó en un aumento significativo y constante de la brotación ni el coeficiente de multiplicación.

Bibliografía.

- Cárdenas-Hernández, J. F., J. G. Alvarez-Herrera, Q. Barragan, E. Rivera, C. Mauricio (2010). Efecto del ácido giberélico y la 6-bencilaminopurina sobre el desarrollo de yemas en injertos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agron. Colomb*, 28(1), 19-27.
- Claret, M. y M. Chirinos (1998). Regeneración y micropropagación de plantas de *Caladium hortulanum*. En: P. Magaña. Libro de Resúmenes VII Congreso Latinoamericano de Botánica. Sociedad Botánica de México.
- Conover, C. A. (1998). *Foliage plants*. Ball Redbook. Ball Publishing.
- Chacón, A. G., L. Gómez, S. Torres, F. Saborío. (2005). Aclimatización de plántulas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas in vitro. *Agronomía Costarricense*, 29(3), 47-58.
- Chamorro, A. H., S. L. Martínez, J. C. Fernández y T. Mosquera. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium* var. *Misty blue*. *Agron. Colomb.*, 25(1).
- Daquinta, M., Y. Lezcano, M. Cid, D. Pina, R. (2005). Morfogénesis in vitro de *Toona ciliata* a partir de raquis de hojas jóvenes con tidiazuron. *Colomb. Biotecnol*, VII (2), 5-9.
- Daquinta, M., Y. Lezcano, M. Escalona, R. Santos (2001). Multiplicación in vitro del banano FHIA-18 con el empleo de paclobutrazol. *Infomusa*, 10(2), 22-24.
- Fontana, M. L., L. A. Mroginski y H. Y. Rey. (2009). Organogenesis and plant regeneration of *Arachis villosa* Benth. (Leguminosae) through leaf cultura. *Biocell*, 33 (3).
- Garriga, M. et al. (2010). Manejo de la Interacción Auxina-Citoquinina para Mejorar el Protocolo Micropropagación de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean J. Agric. Res*, 70(4), 545-551.
- Maity, I., P-D Ghosh, B. K. Jana y T. Bose. (1994). Micropropagation of some house plants. En: J. Prakash; K. R. Bhandary (eds). *Floriculture. Technology, Trades and Trends*. Oxford. Oxford & IBH Publishing.
- Matsumoto, T. K. y A. R. Kuehnle (1997). *Micropropagation of Anthurium*. Y.P. S Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High Technology and Micropropagation*. Springer-Verlag.
- Torres, J. y N. Mogollón (2000). Micropropagación de *Cattleya mossiae* Parker ex Hook mediante brotación axilar inducida por tidiazurón. *Bioagro*, 12(1), 10-14.
- Voyatzi, C., D. G. Voyatzis (1989). In vitro shoot proliferation rate of *Dieffenbachia exotica* cultivar 'Marianna' as affected by cytokinins, the number of recultures and the temperature. *Scientia Horticulturae*, 40, 163-169.

- Werbrouck, S. P., P. C. Debergh (1996). Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in Araceae. *J. Plant Growth Regul*, 15:81-85.
- Zenkteler, E., K. Włodarczak, M. Klosowska (1997). The application of antibiotics and sulphonamide for eliminating *Bacillus cereus* during the micropropagation of infected *Dieffenbachia picta* Schoot. Cassells, A. C. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Kluwer Academic Publishers.
- Zettler, F. W.; R. D., Hartman (1987). Dasheen Mosaic Virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. *Plant Disease*, 71(11), 958-962.

Fecha de recibido: 19 jul. 2013
Fecha de aprobado: 21 sep. 2013