

# SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT): ALTA EFICIENCIA EN LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL PORTAINJERTO HÍBRIDO *PRUNUS PERSICA X P. AMYGDALUS*.

Delfino, P.<sup>1,2</sup>; Rivata, R.<sup>1</sup>; Bima, P.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Fruticultura. Córdoba. Argentina.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Córdoba. Argentina.

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Oleicultura. Córdoba. Argentina.

Delfinop@agro.unc.edu.ar

## RESUMEN

El objetivo del trabajo es desarrollar un protocolo para la propagación masiva y enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* de plantines híbridos de *Prunus persica x P. amygdalus* utilizando un Sistema de Inmersión Temporal (SIT) con la finalidad de multiplicar y conservar estos clones localmente. Se evaluaron diferentes condiciones de cultivo en SIT para 3 ciclos de multiplicación y uno de enraizamiento *in vitro* y su efecto en la aclimatación *ex vitro*. Se plantearon ensayos teniendo en cuenta 3 frecuencias de inmersión (cada 3, 6 y 12 hs), el tipo de explanto utilizado (apical y basal) y se lo comparo con un sistema de cultivo *in vitro* tradicional en medio semisólido. Se evaluó para cada uno de los tratamientos parámetros físicos, bioquímicos y morfológicos durante el crecimiento. Los brotes apicales y la frecuencia de inmersión cada 6 hs, resultó la combinación más conveniente para la propagación *in vitro* de este híbrido. Fue superior en crecimiento, acumulación de materia seca en hojas y tallos, número de nudos generados, tasa de multiplicación y porcentaje de enraizamiento. Por otra parte, el tratamiento con frecuencia de inmersión de 12 hs, obtuvo una mejor performance en contenidos de clorofila total, clorofila a y b y carotenoides. Sin embargo, estos resultados no marcaron significancia en el porcentaje de sobrevivencia en la etapa de aclimatación. En esta etapa, las plantas provenientes del tratamiento de 6 hs de inmersión mostraron alta sobrevivencia durante la aclimatación *ex vitro* (60 %) versus un (50%) de supervivencia de las plantas provenientes del tratamiento de frecuencia de inmersión cada 12 hs.

## INTRODUCCIÓN

La producción de duraznero, especie de importancia para la provincia de Córdoba, se ve afectada por diferentes problemas técnicos y sanitarios que provocan crecimiento lento de las plantas, altos niveles de mortandad, disminución de la vida del huerto y como consecuencia menor productividad. Para solucionarlos se requieren plantas sanas injertadas sobre pies híbridos que superen a los utilizados actualmente. Ensayos realizados en Junín de los Andes, Mendoza, demostraron que utilizar portainjertos híbridos de almendro x duraznero es lo más recomendado para superar problemas de replantación, asfixia radical, nematodos, suelos poco fértiles, secos y alcalinos (Weibel, 2011). Sin embargo, no existen en nuestro país antecedentes concretos sobre la obtención de plantas de calidad de portainjertos híbridos y, en vista a las normas de certificación vigentes (INASE, 2005; SENASA, 2012; SENASA 2013), es necesario disponer de técnicas de propagación adecuadas que permitan multiplicar y conservar nuevos clones, que resulten superiores.

Una alternativa es la producción bajo condiciones *in vitro* donde se pueden obtener plantas uniformes y libres de enfermedades en períodos relativamente cortos (Sadeghiet *al.*, 2015). Existen hasta el momento protocolos de propagación de híbridos de *Prunus* a través de sistemas *in vitro* tradicionales en medios semisólidos (Rivata *et al.*, 2010; Kose, 2015). Sin embargo, estos se ven limitados por una disminución en el potencial de multiplicación durante el crecimiento a largo plazo y repetidos subcultivos *in vitro* (Abbasi *et al.*, 2019). Se han desarrollado en los últimos años sistemas de producción *in vitro*, denominados biorreactores, que permiten el crecimiento de tejidos en medios de cultivo líquidos. Estos biorreactores, han resultado superadores a los sistemas tradicionales permitiendo obtener vitroplantas de mayor tamaño y peso seco, lo que se traduce en un menor porcentaje de mortandad y en un crecimiento postransplante más rápido (Adelberg, 2005). Además, han reducido los costos, con mayor eficiencia energética y de uso del trabajo en la propagación de un elevado número de especies (Farahani Y Majd, 2012; Rocano, 2017). No obstante, presentan como desventaja generar problemas de asfixia e hiperhidricidad de los

tejidos de las vitroplantas si el ajuste de la duración y frecuencia de los periodos de inmersión no es preciso (Georgiev, 2014). Estos trastornos fisiológicos también podrían ser promovidos a causa del tipo de explante utilizado según reportes de Torrents Pallarès, 2013.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* del híbrido *Prunus persica x P. amygdalus* bajo un sistema de inmersión temporal considerando el efecto del tipo de explante y diferentes frecuencias de inmersión. El protocolo reportado puede ser utilizado para su propagación masiva, produciendo plantas en número y calidad equivalente o mejor a métodos reportados de cultivo en medios semisólidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

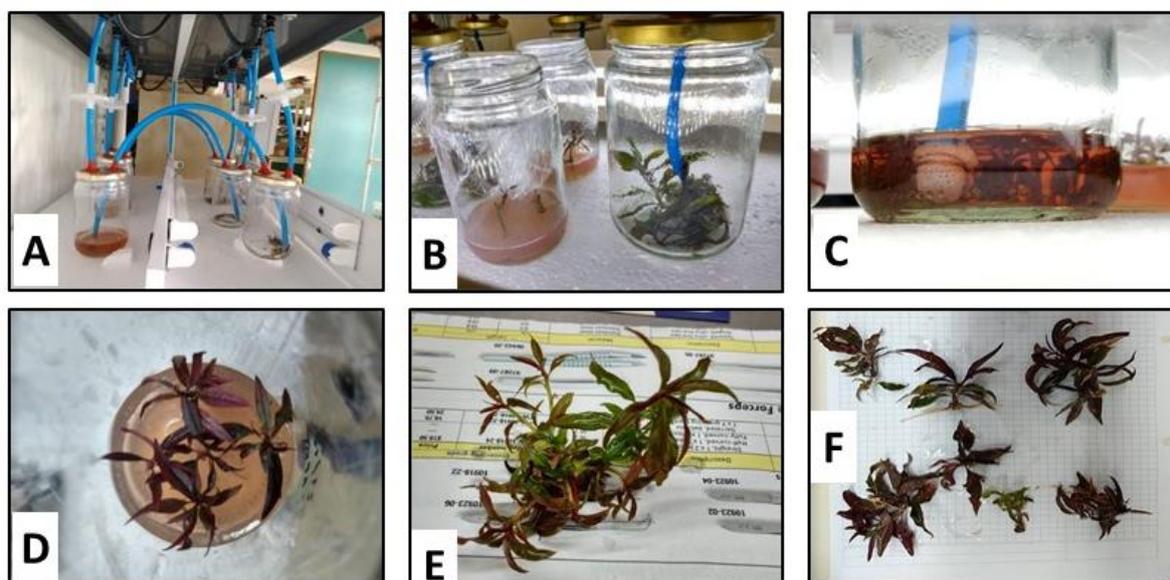
Se evaluó el desarrollo del híbrido *P. persica x P. amygdalus* (*Garfinem*) en el sistema de inmersión temporal (SIT), diseñado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal-FCA (**Figura 1**), y se lo comparó con el sistema tradicional descrito por Rivata *et al.*, (2010). Los estudios se realizaron para 3 subcultivos en etapa de multiplicación, uno, en etapa de enraizamiento y en la aclimatación. Se compararon dos tipos de explantos (basales y apicales) y 3 frecuencias de inmersión (inmersión cada 12, 6 y 3 hs) con el sistema tradicional (testigo).

**Material vegetal inicial:** El material de partida de los ensayos fueron explantos introducidos *in vitro* del híbrido *P. persica x P. amygdalus*, a partir de segmentos nodales de plantas madres mantenidas *in vitro* en el Laboratorio

de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC). Los explantos introducidos se mantuvieron 30 días en medio de cultivo WPM modificado suplementado con BA (Bencil adenina) 0.5 mg l<sup>-1</sup> y 0.001 mg l<sup>-1</sup> de IBA (Ácido indol butírico) según Rivata *et al.*, (2010). Las microplántulas obtenidas en esta etapa que alcanzaron un tamaño mayor a 2 cm de largo se utilizaron para establecer el ensayo.

**Condiciones de cultivo:** La formulación de los medios de cultivo para todo el ensayo fue: Sales WPM modificado, sacarosa 30 g. l<sup>-1</sup>, suplementado con IBA 0.01 mg l<sup>-1</sup> y BA 1 mg l<sup>-1</sup> en las etapas de multiplicación e IBA 1 mg l<sup>-1</sup>, en la etapa de enraizamiento como lo indica el protocolo de Rivata *et al.*, (2010). En el tratamiento de medio semisólido se suplemento además con 8 g. l<sup>-1</sup> de agar. Las soluciones nutritivas se ajustaron a un PH de 5.7 y posteriormente fueron esterilizadas en autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Las condiciones de crecimiento en la cámara de cría fueron iguales para todos los tratamientos (temperatura de 23 °C y un fotoperiodo de 16 hs).

**Ensayo:** Para comparar en el desempeño de los sistemas SIT y tradicional se planteó iniciar los tratamientos con medio líquido (sistema SIT), con 10 explantos por unidad de cultivo, con 100 ml de medio líquido en 4 unidades de cultivo (repeticiones) por cada una de las 3 frecuencias de inmersión comparadas: inmersión cada 12 hs (F1); inmersión cada 6 hs (F2); inmersión cada 3 hs (F3). El tiempo de inmersión en todos los tratamientos fue de 1 minuto (Torrents Pallarès, 2013). El sistema tradicional,



**Figura 1.** Producción *in vitro* de plantas del híbrido *P. persica x P. amygdalus*: **A)** Módulo de sistema de inmersión temporal (SIT); **B)** plantas en etapa de multiplicación, en SIT (derecha) y tradicional, en medio semisólido (izquierda); **C)** detalle de fase de inmersión en medio líquido (SIT); **D)** plantas del sistema tradicional, al momento del repique; **E)** planta del SIT al momento del repique; **F)** plantas del SIT enraizadas.

en cambio, se inició con 5 frascos (repeticiones) con 5 explantos cada uno con 50 cc de medio semisólido. Para ambos sistemas se realizaron repiques cada 30 días, momento en el que además se renovó el medio de cultivo (Damiano *et al.*, 2005). Para la etapa de multiplicación se realizaron 3 repiques. A partir del segundo repique en la etapa de multiplicación, se seleccionaron explantos de cada tratamiento para dar continuidad del cultivo en la siguiente etapa de propagación *in vitro*. Estos explantos se clasificaron en apicales o basales. Los primeros son brotes de 2 cm de largo o más obtenidos del extremo apical de la vitroplanta madre. Los explantos basales, son brotes de 2 cm de largo o más que se obtuvieron al cortar brotes que surgieron en la sección basal de la planta madre (**Figura 2**).

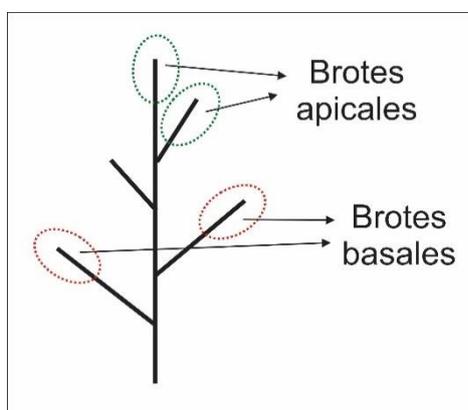


Figura 2. Esquema de una vitroplanta madre que muestra los brotes apicales y basales que se utilizaron para iniciar un nuevo subcultivo.

Se obtuvieron así 6 tratamientos compuestos por 2 unidades de cultivos (F1apical, F1basal, F2apical, F2basal, F3apical, F3basal) más el testigo en medio sólido. Estos tratamientos se mantuvieron para las siguientes etapas de multiplicación, luego pasaron a la etapa de enraizamiento y sucesivamente se trasladaron para su aclimatación. Esta se realizó trasladando 10 vitroplantas de cada uno de los tratamientos en tubetes (**Figura 3**).

Se utilizó como sustrato partes iguales de perlita, vermiculita y turba, que fue esterilizado previamente con autoclave a 121°C durante 2 hs. Las plantas trasladadas se cubrieron con polietileno transparente durante los primeros 15 días. Posteriormente el cobertor fue retirado gradualmente. Se realizaron dos riegos diarios durante los primeros 10 días y posteriormente un solo riego, con una solución de macronutrientes al 10%, hasta concluir el periodo de aclimatación.

#### Variables analizadas:

Tanto para las etapas de multiplicación y enraizamiento *in vitro*, las muestras se recogieron en el momento de realizar cada repique. Para la aclimatación, las variables

no destructivas se midieron a los 5, 15 y 30 días, mientras que las variables destructivas se midieron al finalizar la misma. Entre las variables analizadas se encuentran:

**Variables físicas:** se analizaron altura de planta, número de nudos, peso seco, peso fresco, cantidad de brotes, largo de raíces. Con medición directa se determinó la altura del explante, largo de raíces y número de brotes generados. El peso fresco y seco de tallos y hojas se determinó por medio de su pesaje en balanza de precisión, antes y después de secarse en estufa a 60°C, durante 72 hs. En todos los casos se analizaron 5 muestras (vitroplantas completas) extraídas en el momento del repique para todos los tratamientos.

**Variables bioquímicas:** se determinó la cantidad de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides en hojas a través de técnicas colorimétricas descritas por Dahot, (2012) y Chen y Chen, (2002). Para ello se recolectaron 3 muestras de 2 vitroplantas por cada tratamiento. La extracción de pigmentos se realizó con acetona 80% y la determinación colorimétrica se realizó con espectrofotómetro DS-11 (*DeNovix*).

#### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) y un análisis de la varianza (ANOVA) de las medias obtenidas por el método de comparaciones múltiples LSD-Fischer al 5% de significancia, utilizando el software InfoStat, versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).



Figura 3. Microplantas del híbrido *P. persica* x *P. amygdalus* durante la etapa de aclimatación *ex vitro*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos, se observó que el sistema de inmersión temporal, presenta mejor eficiencia productiva para lograr vitroplantas del híbrido Garfinem.

Esto se evidencia en el tamaño de las plantas obtenidas, mayor número de nudos por vitroplanta, que se refleja en una mayor tasa de multiplicación. También con este sistema se obtuvieron vitroplantas mejor provistas de pigmentos fotosintéticos y de materia seca. Cabe mencionar que, bajo las mismas condiciones nutricionales y hormonales, las vitroplantas desarrolladas en el sistema de inmersión, tuvieron una mayor tendencia a formar raíces y esta diferencia fue significativa en algunos tratamientos.

En cuanto al análisis de las condiciones de cultivo del sistema de inmersión temporal durante las etapas de multiplicación, el tratamiento de 6 hs de frecuencia de inmersión fue el de mejor desempeño productivo, superando a los tratamientos de 12 hs y 3 hs. Se pudo observar un largo mayor de los explantos, mayor tasa de multiplicación y mayor proporción de nudos con brotes. Además, con esta condición de cultivo se obtiene un mayor peso seco de hojas y tallos. Sin embargo, el contenido de pigmentos en las vitroplantas fue mayor en el tratamiento de 12 hs de frecuencia de inmersión, siendo esta diferencia significativa con respecto al tratamiento de 6 hs de periodo de inmersión (**Tabla 1**).

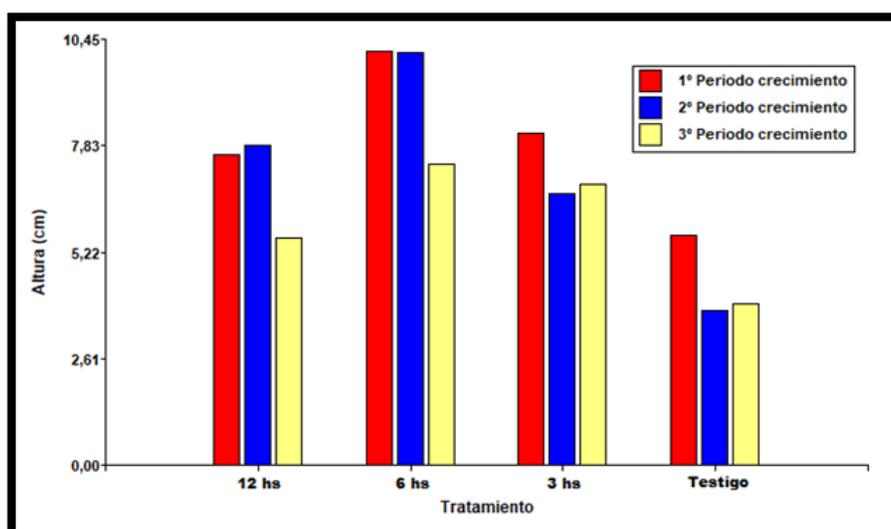
El número de subcultivos realizados tuvo efecto sobre el desempeño productivo en los diferentes tratamientos. Cuando la frecuencia de inmersión fue cada 6 y 12 hs la altura del explante se redujo a partir del tercer repique, mientras que con frecuencias de 3 hs y en medio semisólido, disminuyó a partir del segundo repique (**Figura 4**). De la misma forma, el contenido de pigmentos

se redujo significativamente a lo largo de los diferentes subcultivos. Vale resaltar que el peso seco de los explantes no siguió con este patrón y se mantuvo estable. También se comparó el uso de dos tipos de explantos como material de inicio en los diferentes subcultivos. Encontrándose diferencia en el peso seco, a favor del explante apical, respecto del basal. Sin embargo, el tipo de explante utilizado no afectó al contenido de pigmentos encontrados en las vitroplantas después de cada periodo de crecimiento.

El tratamiento de 3 hs de frecuencia de inmersión, no se destacó productivamente sobre el resto de los tratamientos en SIT, pero sí lo hizo sobre el testigo (medio semisólido). En cuanto a la calidad de las vitroplantas estas no se destacaron en acumulación de materia seca ni en contenido de pigmentos. Hay que resaltar que este fue el único tratamiento dónde se desarrollaron plantas vítreas.

En cuanto a la etapa de enraizamiento, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos respecto a la longitud de las raíces generadas. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos de 12 y 6 hs de frecuencia de inmersión. Tampoco hubo diferencia en la acumulación de materia seca entre tratamientos, aunque sí hubo diferencia en la concentración de pigmentos alcanzados en los tejidos de las plantas del tratamiento de frecuencia de 12 hs.

En la aclimatación, los mejores resultados se obtuvieron de plantas provenientes de los tratamientos de 6 y 12 hs de frecuencia de inmersión. La supervivencia para estos tratamientos fue de 60% y 50%, respectivamente, siendo ampliamente superior a la supervivencia encontrada en las plantas provenientes de los tratamientos testigo (10%) y 3 hs de periodo de inmersión (15%) (**Tabla 2**).



**Figura 4.** Altura de plantas del híbrido Garfinem en cada uno de los tres repiques (períodos de crecimiento) cultivados en biorreactores con tres frecuencias de inmersión (3, 6 y 12 hs) y en medio semisólido (testigo).

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un sistema de inmersión temporal (SIT) lo suficientemente plástico para adaptarlo a diferentes condiciones de cultivos, volúmenes de medio, recipientes, etc., de esta forma se puede realizar diferentes ensayos en esta u otras especies sin necesidad de grandes modificaciones del sistema.

Se obtuvo un protocolo para la multiplicación bajo este sistema, del híbrido *Garfinem* (*P. persica* x *P. amygdalus*),

que supera al que tradicionalmente se utiliza, demostrado por variables físicas y bioquímicas que definen la calidad de las plantas.

Los brotes apicales y la frecuencia de inmersión cada 6 hs, es la más conveniente para la propagación *in vitro* de este híbrido. Por otra parte, las plantas provenientes de este tratamiento tuvieron una sobrevivencia de 60 %, lo que permite salvar el cuello de botella que implica la etapa de aclimatación *ex vitro*, sobre todo en especies leñosas.

Altura de plantas (cm)					Número de nudos				
Tratamiento	Medias	n	E.E		Tratamiento	Medias	n	E.E	
Testigo	7,41	29	1,56	A	Testigo	2,00	29	0,41	A
3 hs	8,49	47	1,22	A	3 hs	2,53	106	0,21	A
12 hs	10,43	46	1,24	A	12 hs	2,66	107	0,21	A
6 hs	13,92	50	1,19	B	6 hs	3,76	93	0,23	B

Número de explantes apicales generados					Peso seco de plantas (mg)				
Tratamiento	Medias	n	E.E		Tratamiento	Medias	n	E.E	
3 hs	1,31	106	0,15	A	testigo	0,04	30	0,01	A
12 hs	1,65	107	0,15	A	3hs	0,07	30	0,01	B
testigo	1,72	29	0,29	A B	12 hs	0,07	30	0,01	B C
6 hs	2,24	93	0,16	B	6 hs	0,09	30	0,01	B C

Contenido de carotenoides (mg*g <sup>-1</sup> de MS)					Contenido de clorofila (mg*g <sup>-1</sup> de MS)				
Tratamiento	Medias	n	E.E		Tratamiento	Medias	n	E.E	
6 hs	1,47	36	0,05	A	3 hs	2,23	12	0,55	A
testigo	1,47	35	0,06	A	6 hs	4,86	12	0,55	B
3 hs	1,50	36	0,05	A	testigo	7,25	12	0,55	C
12hs	1,72	35	0,06	B	12hs	9,15	12	0,55	D

**Tabla 1.** Diferencias significativas de valores promedio de variables físicas y bioquímicas, medidas en tres repiques sucesivos durante la etapa de multiplicación de plantas del híbrido *Garfinem* cultivado en tres frecuencias de inmersión (3, 6 y 12 hs) y en medio sólido (testigo).

Tratamiento		Nº de plantas vivas a los				Porcentaje	
		0 días	5 días	15 días	30 días	Final	Promedio
12	Apical	10	10	9	6	60	50
	Basal	10	10	5	4	40	
6	Apical	10	10	8	7	70	60
	Basal	10	10	6	5	50	
3	Apical	10	10	6	2	20	15
	Basal	10	10	4	1	10	
Testigo		10	10	1	1	10	10

**Tabla 2.** Número de plantas vivas y porcentaje de supervivencia por tratamiento después del repique en la etapa de aclimatación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba por subsidiar este trabajo de investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, F., Khadivi, A., Taghizadeh, M., & ValizadehKaji, B. (2019). Micropropagation of *Prunus scoparia*, a Suitable Rootstock for Almond under Drought Conditions. *International Journal of Fruit Science*, 19(2), 221-230.
- Adelberg J. 2005. Efficiency in thin-film liquid system for Hosta micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 81(3), 359-368.
- Chen C. and Chen J. J. 2002. Measurement of gas exchange rates in plant tissue culture vessels. *Plant cell, tissue and organ culture*, 71(2): 103-109.
- Dahot M. U. 2012. Comparative characteristics of micropropagated plantlets of banana from bbtv-infected explants to its normal and saline stressed cultures. *Pakistan Journal of Botany*, 44(3): 1127-1130.
- Damiano C., La Starza S. R., Monticelli S., Gentile A., Caboni E., and Frattarelli A. 2005. Propagation of *Prunus* and *Malus* by temporary immersion. In *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Ed. Springer Netherlands, pp. 243-251.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Farahani F., and Majd A. 2012. Comparison of liquid culture methods and effect of temporary immersion bioreactor on growth and multiplication of banana (*Musa*, cv. Dwarf Cavendish). *African Journal of Biotechnology*, 11(33), 8302-8308.
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., & Bley T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607-621.
- INASE. 2005. Instituto Nacional de Semillas. Resolución 834/2005.
- Kose S. 2015. *In Vitro* Propagation of 'Garnem' (*P. persica* x *P. dulcis*) Rootstock. *Journal of Plant Molecular Biology and Biotechnology*, 5(1), 25-30
- Rivata, R., Bima, P., Gilesky, N., Gual, L. 2010. Avances en la obtención de un protocolo para el cultivo in vitro del híbrido Garfinem (almendro x durazno). *Análisis de Semillas*, Tomo IV, Volumen IV, N° 16, Año 2010.
- Rocano, M. N., Villena, P. G., and Peña, D. F. (2017). Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica*. *Maskana*, 8(1), 103-109.
- Sadeghi F., Yadollahi A., Kermani M. J., & Eftekhari M. 2015. Optimizing culture media for *in vitro* proliferation and rooting of Tetra (*Prunus empyrean*) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(1), 19-23.
- SENASA. 2012. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Resolución 203/2012.
- SENASA. 2013. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Disp. DNPV N° 4/2013
- Torrents Pallarès S. 2013. Els bioreactors d'immersió temporal com a millora de les tècniques clàssiques de micropropagació del peuhíbrid GF-677 (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*) i del nabiu (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi. Tesis doctoral. Universitat politècnica de catalunya. Barcelona. España. pp. 98
- Weibel A. 2011. Duraznero: Portainjertos tolerantes al replante. FRDEPI. Federación Plan Estratégico Durazno para Industria. INTA EEA Junín. Mendoza. URL <http://www.fepedi.com.ar/?p=160>. Activo mayo 2020.