

Evaluación de un Sistema de Inmersión Temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales

Albarracín, P., Jadán, M., Peña, C.

Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida.

Escuela Politécnica del Ejército

Sangolquí, Ecuador

cpacosta@hotmail.com

Abstract— In this investigation, *Eryngium foetidum* (spirit weed) was used as a model plant in order to develop future projects about micropropagation of other productive and economically interesting species through temporary immersion systems (TIS). Besides, *E. foetidum* has some potential characteristics which could be used on future investigations on metabolite production for pharmacological and industrial purposes. At the establishment stage of micropropagation of spirit weed, leaves, petioles, and axilar buds were used by applying different concentrations of NaClO. The most viable result was to axilar buds which were surface sterilized using a commercial detergent and disinfected on 0.8% (v/v) of NaClO for 10 minutes. The buds inoculated on Murashige&Skoog (MS) medium. *E. foetidum* plants were regenerated through direct organogenesis by using different concentrations of growth regulators. Adventitious multiple shoots, a 100% of buds laid on shoot formation and an average of 2.7 shoots per bud resulted from MS medium supplemented with 1.5mgL⁻¹ BAP and 0.1mgL⁻¹ ANA. At the conventional multiplication stage, three subcultures were done in order to obtain several shoots and aseptic plants. Third subculture plantlets were inoculated on TIS by assaying different frequencies, immersion times and inoculation densities. The multiplication on TIS allowed obtaining higher plantlets per shoot, longer and wider leaves, and higher proliferation rates (7 – 8) compared with those multiplied through the conventional method. This process resulted to be more efficient by using a four hour frequency, two minutes for the immersion time and a inoculation density of three explants per TIS as control parameters over a Murashige&Skoog liquid medium supplemented with 2.5mgL⁻¹ BAP, 0.1mgL⁻¹ ANA and 5 mgL⁻¹ de BRA.

Keywords- ; yemas, organogénesis directa, SIT; subcultivo; índice de multiplicación

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las producciones y estudios tecnológicos han tomado un carácter prioritario en la economía a nivel mundial, y Ecuador no es la excepción. De allí que en

nuestro país se están adoptando políticas que permitan el desarrollo de investigaciones que aporten a la realización de este fin. En Ecuador se invierte recursos materiales y humanos para desarrollar tecnologías de información que humanicen los procesos de investigación biotecnológicos y eleven la producción masiva de recursos. Sobre este aspecto, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, con sus diferentes estrategias de micropropagación, permite la obtención de plántulas élite que puede ir desde producciones a nivel de laboratorio o a nivel industrial y comercial. Existe la necesidad de utilizar tecnologías innovadoras que tiendan a automatizar la micropropagación, como también a mejorar los protocolos de producción y aclimatación de las plántulas *in vitro*. Esta tecnología se está desarrollando también en Ecuador, debido a que permite la automatización de todas, o algunas de las etapas de la micropropagación y presenta diversas ventajas como reducción de la mano de obra, costo bajo de producción de las plantas, reducción en el empleo de agar para producción masiva, entre otras.

El desarrollo de la presente investigación permitirá someter a comprobación los antecedentes acerca de la producción de plantas en un sistema de inmersión temporal reportados por Winkelmann y colaboradores (2006) que indican que en biorreactores, la obtención de plántulas reduce los costos de producción entre un 50 y un 60%. Además, estos sistemas superan a los tradicionales de producción de plantas *in vitro* debido a que son más baratos, dada la sustitución de la materia sólida que sirve de alimentación de las plantas por una disolución acuosa mucho más económica. Por otro lado los sistemas basados en inmersión temporal permiten elevar la eficiencia en la producción, se puede también proveer la posibilidad de controlar los parámetros del sistema, en función del tipo de cultivo a producir, así como dotar de un conjunto de herramientas que permitan realizar investigaciones sobre las condiciones ideales para la producción de determinada

variedad de cultivo, lo que justifica la implementación de un sistema automatizado flexible que permita el escalado de la propagación de cilantro (*Eryngium foetidum*) a nivel industrial (Winkelmann, et al., 2006) .

El cilantro cimarrón es una planta herbácea de la familia del perejil. Su género *Eryngium* pertenece a la familia Apiaceae del orden de las Apiales (SIIT, 2009). Dentro de éste género existen aproximadamente 200 especies de las cuales 30 se distribuyen en Argentina. Siete especies conocidas del género *Eryngium* son predominantes en América tropical; entre ellas están: *E. chubutense*, *E. coronatum*, *E. echinatum*, *E. ekmanii*, *E. divaricatum*, *E. dorae*, *E. foetidum*, entre otras (Martínez, et al., 2001).

El cilantro es rico en ciertos minerales y vitaminas como carotenos, riboflavinas, que son responsables del olor y sabor característico de *Eryngium foetidum*; por ello, ésta especie es ampliamente utilizada para propósitos culinarios (Ramcharan, 1999). Aunque la apariencia de *E. foetidum* y *C. sativum* es muy similar; el aroma del cilantro cimarrón es más intenso.

El uso medicinal del cilantro representa también una característica apetecible por diversos mercados que buscan el uso de la medicina alternativa como una fuente de curación para diversas enfermedades (Ramcharan, 1999). Por otro lado, su aceite esencial que consiste en alrededor de 40 componentes tiene un alto valor comercial en el mercado internacional. El aceite puede ser empleado para realizar rituales de aromaterapia como para el uso cosmético y la industria de la perfumería (Gayatri, et al., 2006).

El empleo de Sistemas de Inmersión Temporal permite la automatización de procesos de micropropagación de varias plantas de interés comercial y económico, tal es el caso de café, piña, banano, frambuesas, entre otras (Pérez, 1998). Así existen diversas ventajas respecto al uso de medios líquidos en procesos de micropropagación de especies vegetales las cuales se refieren principalmente a la reducción de costos en la producción masiva de plántulas y la automatización de procesos propios de dicha técnica.

El cultivo en medio líquido ofrece diversas mejoras respecto al cultivo en medio sólido con el empleo de agar, entre las cuales se encuentran el proveer de condiciones de cultivo más uniformes, el medio de cultivo puede ser renovado sin cambiar de contenedor, la esterilización es posible mediante ultrafiltración y la limpieza de los contenedores resulta menos laboriosa. Además, se pueden emplear contenedores de grandes volúmenes en donde prácticamente la totalidad de su espacio es cubierta mientras que en la multiplicación convencional con agar se necesitan cultivos planos; los tiempos de transferencia se ven reducidos en vista de que los explantes no se encuentran posicionados en un determinado sitio (Berthouly & Etienne, 2005).

Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo principal el evaluar la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal frente a la propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales con la finalidad de comparar los dos métodos de propagación y en miras de una producción masiva de la especie de estudio, así como de otras especies de interés.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Fuente y preparación de los explantes

El material vegetal fue recolectado de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas y trasladado al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales – Sangolquí. Las plantas madre fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero a una temperatura entre $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa entre 60 y 70%. Se seleccionaron tres tipos de explantes para la regeneración de plantas de cilantro cimarrón (*E. foetidum*). Los segmentos nodales, yemas y hojas fueron escindidos en secciones de aproximadamente 6 a 8 cm. Se lavaron los explantes en agua corriente por aproximadamente 10 minutos; a continuación, se sumergieron en una solución de detergente comercial 1%p/v por 15 minutos tras lo cual se efectuaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Se realizó la desinfección de los explantes con una solución de fungicida (1%p/v) por 10 minutos tras lo cual se efectuaron tres lavados con agua destilada estéril. Se sumergieron los explantes en etanol (70% v/v) por 30 segundos; seguido éstos fueron colocados en diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio por diferentes tiempos de inmersión, que para el caso de hojas corresponde a combinaciones entre 0.4% - 0.6% de NaClO por 6 y 8 minutos; mientras que para yemas y segmentos nodales en combinaciones de 0.7% - 0.9% de NaClO en tiempos de inmersión de 8 y 10 minutos.

B. Medio de cultivo y condiciones

Los explantes ya desinfectados se cortaron en tamaños adecuados (hojas de 1cm^2 , yemas y segmentos nodales en secciones de 2 a 3 cm) manteniéndolos sumergidos en una solución de 250mgL^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP) y posteriormente inoculados en medio MS estéril (Murashigue&Skoog, 1962) suplementado con 35mgL^{-1} de ácido ascórbico, 250mgL^{-1} de PVP, y con combinaciones de 1 y 1.5mgL^{-1} de bencilaminopurina (BAP), 0.1 y 0.2mgL^{-1} de dos tipos de auxinas: ácido indolacético (AIA) o ácido naftalenacético (ANA); adicionado con 30gL^{-1} de azúcar y 6.3gL^{-1} de agar.

El pH del medio fue ajustado a 5.75 antes de la adición del agar. Los medios fueron autoclavados a 15 psi de presión por 30 minutos. Los cultivos fueron incubados manteniendo un fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad a una temperatura entre $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

C. Multiplicación convencional

Para la fase de multiplicación, se empleó el medio de cultivo sólido con mejores resultados en la fase de inducción. Se realizaron tres subcultivos sucesivos que permitieron evaluar las variables, que serán detalladas en la siguiente sección, con la finalidad de comparar el método de propagación convencional con el efectuado en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT). El medio de cultivo para los subcultivos consiste en MS estéril suplementado con 35 mgL⁻¹ de ácido ascórbico, 250 mgL⁻¹ de PVP, 1.5 mgL⁻¹ de BAP, 0.1 mgL⁻¹ ANA; adicionado con 5 mgL⁻¹ de Brasinolida (BRA) 30 gL⁻¹ de azúcar y 6.3 gL⁻¹ de agar. Los cultivos fueron incubados bajo las mismas condiciones mencionadas previamente.

D. Multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal

Para esta fase se realizaron dos tipos de experimentos diferentes, en donde inicialmente se aplicaron tratamientos en los que se varía parámetros de control como frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo empleando el mismo medio de cultivo de la multiplicación convencional sin la adición del agar, ya que este tipo de sistema emplea medios de cultivo líquidos. Mientras que por otro lado, se realizó un ensayo en el SIT en el que se emplearon diferentes medios de cultivo que permitan una mayor proliferación de brotes. Para los dos casos el volumen de medio de cultivo se estableció en 500 ml por SIT, y los ciclos de inmersión fueron desarrollados con una presión de 8 psi de aire filtrado durante 22 días de duración por ciclo.

E. Prueba de parámetros en el SIT

Se empleó el material vegetal proveniente del tercer subcultivo de la multiplicación convencional. Se utilizaron unidades de SIT para las cuales, de acuerdo a los tratamientos planteados, se varió el tiempo de inmersión de 1 a 3 minutos, frecuencias de 4 y 6 horas y densidades iniciales de inóculo de 3 y 6 explantes por unidad de SIT. El medio de cultivo consiste de las sales del MS suplementado con 1.5 mgL⁻¹ de BAP, 0.1 mgL⁻¹ ANA, 5 mgL⁻¹ de Brasinolida, 250 mgL⁻¹ de PVP, 35 mgL⁻¹ ácido ascórbico y enriquecido con 30gL⁻¹ de azúcar.

F. Prueba de medios de cultivo en el SIT

El material vegetal empleado fueron brotes del tercer subcultivo de la multiplicación convencional que se inocularon en unidades de SIT programado con los parámetros de control determinados con mejores resultados de la prueba anterior (tiempo de inmersión = 2 minutos; frecuencia = 4 horas; densidad del inóculo = 3 explantes por SIT). El medio de cultivo empleado contiene las sales del MS suplementado

con 0.1 mgL⁻¹ ANA, 5 mgL⁻¹ de Brasinolida, 250 mgL⁻¹ de PVP, 35 mgL⁻¹ ácido ascórbico, enriquecido con 30gL⁻¹ de azúcar y concentraciones diferentes de BAP entre 0 y 3 mgL⁻¹ de hormona.

G. Procesamiento estadístico

Se utilizó el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2011e y se efectuaron pruebas de chi – cuadrado, análisis de varianza

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Establecimiento *in vitro*

Para la fase de desinfección de los tres tipos de explantes de cilantro cimarrón, fueron evaluadas las variables: contaminación, oxidación y viabilidad. En la tabla 1, se observan los tratamientos de desinfección aplicados sobre hojas, segmentos nodales y yemas de *E. foetidum*, además de los porcentajes de explantes observados tras los 30 días de la siembra que presentaban contaminación, oxidación y falta de viabilidad.

Asimismo, la figura 1, permite visualizar los porcentajes correspondientes para cada protocolo de desinfección, siendo para las hojas el tratamiento 1 (0.4% NaClO – 6 min) el con mayor porcentaje de éxito debido a que existió 0% de explantes contaminados y muertos y la oxidación fue superada. Dicho efecto de reducción de la oxidación puede ser atribuida al empleo de polivinilpirrolidona (PVP) incorporado al medio de cultivo, tal como lo cita Yassen (2002), a más de los lavados previa la inoculación del explante.

Por otro lado, las yemas y segmentos nodales requirieron de mayores concentraciones de NaClO para su desinfección; para los segmentos nodales se obtuvo 0% de explantes contaminados, pero un 8.3% de mortalidad y oxidación pese al uso del antioxidante (PVP) mencionado, al ensayar el tratamiento 3 (0.8% NaClO – 8 min). Adicionalmente, para las yemas de cilantro cimarrón, el tratamiento con mejores resultados corresponde al empleo de 0.8% de NaClO en 10 minutos de inmersión (tratamiento 4), siendo el porcentaje de contaminación 18.2% de los explantes ensayados, y no viables, mientras que se obtuvo un favorable 0% de oxidación en yemas. Al contrastar los tratamientos para los dos últimos explantes, éstos difieren en el tiempo de contacto con el agente desinfectante (cloro) entre 8 y 10 minutos para segmentos nodales y yemas respectivamente.

Es así que en el ANOVA efectuado para este factor respecto a la oxidación, se obtuvo un valor $p < 0.001$ lo que indica diferencia entre los tiempos ensayados sobre segmentos nodales, con lo que se confirma lo descrito por Wiley (2008), quien enuncia que tiempos de inmersión menos prolongados

resultan más eficientes sobre la contaminación frente a las concentraciones del agente desinfectante (NaClO). Mientras que para yemas, pese al no mostrar diferencia estadística significativa el porcentaje de oxidación es del 0% permitiendo

una mayor viabilidad de los explantes y por ende una respuesta más rápida frente a los reguladores de crecimiento.

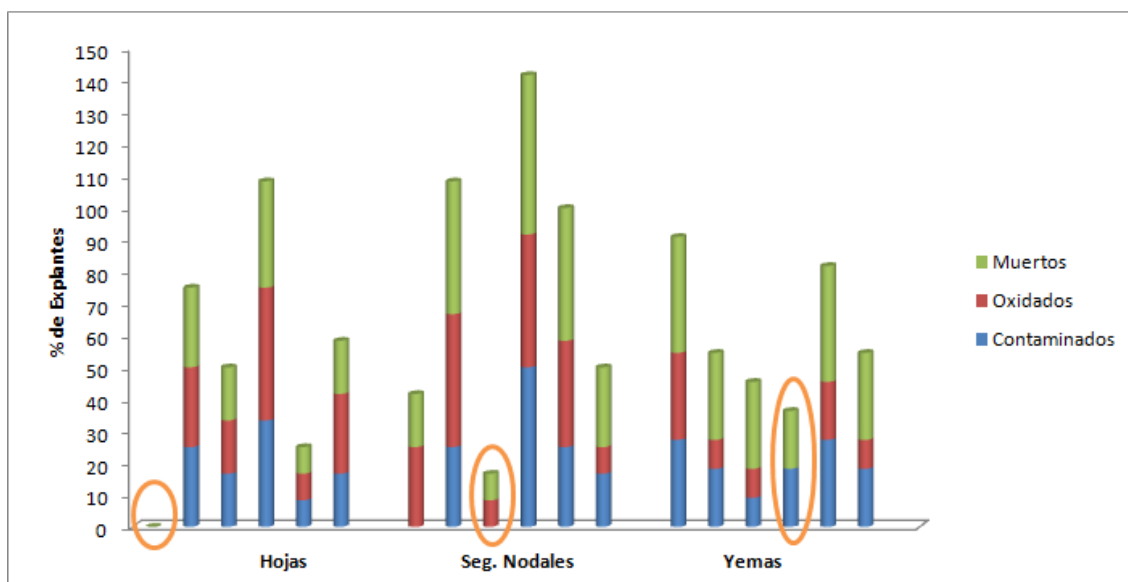
Tabla 1. Porcentajes de explantes contaminados, oxidados y muertos respecto a los tratamientos de desinfección ensayados en la etapa de establecimiento de *E. foetidum*.

Explante	Tratamiento [NaClO] (%) - tiempo inmersión (min)	% Contaminados	% Oxidados	% Muertos
Hojas	0.4% - 6m	0	0	0
	0.4% - 8m	25	25	25
	0.5% - 6m	16.7	16.7	16.7
	0.5% - 8m	33.3	41.7	33.3
	0.6% - 6m	8.3	8.3	8.3
	0.6% - 8m	16.7	25	16.7
Segmentos nodales	0.7% - 8m	0	25	16.7
	0.7% - 10m	25	41.7	41.7
	0.8% - 8m	0	8.3	8.3
	0.8% - 10m	50	41.7	50
	0.9% - 8m	25	33.3	41.7
	0.9% - 10m	16.7	8.3	25
Yemas	0.7% - 8m	27.3	27.3	36.4
	0.7% - 10m	18.2	9.1	27.3
	0.8% - 8m	9.1	9.1	27.3
	0.8% - 10m	18.2	0	18.2
	0.9% - 8m	27.3	18.2	36.4
	0.9% - 10m	18.2	9.1	27.3

Al analizar la viabilidad de los explantes tras la fase de desinfección, en el caso de hojas, pese a encontrarse una descontaminación del 100% de explantes ensayados y 0% de oxidación y mortalidad, la respuesta de este tipo de tejido fue nula frente a la formación de brotes, contradictorio a lo reportado por Gayatri y colaboradores (2005) quienes

obtuvieron un 38% de respuesta a la iniciación de brotación. Si bien la viabilidad de este tipo de explantes tras el período de observación (30 días) corresponde al 100%, al realizar posteriores observaciones no se encontró respuesta embriogénica ni organogénica para hojas de cilantro cimarrón.

Figura 1. Porcentajes de explantes en los mejores tratamientos de desinfección en el establecimiento in vitro de *E. foetidum*.



B. Inducción a brotes

Respecto a la evaluación de la fase de inducción a brotes de *E. foetidum*, se consideraron las variables: formación de brotes, número de brotes por explante, longitud de brotes y ancho de sus hojas. Únicamente segmentos nodales y yemas exhibieron respuesta a los reguladores de crecimiento ensayados (Arockiasamy, *et. al.*, 2002). Una vez transcurridos 30 días tras la inoculación de los explantes en los diferentes medios de cultivo, se observó respuesta de brotación (Tabla 2) con variaciones de porcentaje para los dos tipos de explantes.

Es así que para yemas se observa un 69.1% de formación de brotes comparada con un 25% para segmentos nodales, resultado que se contrasta con lo reportado por Arockiasamy y colaboradores (2002) quienes al emplear segmentos nodales obtienen un 21.6% de formación de brotes a partir de dichos explantes. Por otro lado, el porcentaje de formación de callo a partir de yemas es menor al encontrado para segmentos nodales, siendo del 18.8% y 31.1% respectivamente. Para la presente investigación, el método de regeneración de plántulas requerido es la organogénesis directa; sin embargo, se evaluó también la formación de callo organogénico cuyo porcentaje encontrado para segmentos nodales es mayor al reportado por Martin (2004) quien obtuvo un 15% de callo embriogénico al emplear el mismo explante con diferentes reguladores de crecimiento (Figura 2).

En cuanto al número de brotes, las yemas dieron como resultado mayor proliferación de dichas estructuras morfológicas por explante inoculado respecto a los segmentos nodales (33 y 125 brotes respectivamente) (Tabla 2). Siendo el tratamiento 7 (1.5 mgL⁻¹ BAP, 0.1 mgL⁻¹ ANA), para los dos

tipos de explantes, en el que se obtuvieron mejores resultados, resultado similar al obtenido por Gayatri y colaboradores (2005) en donde a partir de hojas se obtuvo un 88% de respuesta de iniciación de brotes al emplear 1.5 mgL⁻¹ de BAP.

El promedio de longitud de brotes a partir de yemas, y el ancho de sus hojas resultaron ser mayores en comparación al promedio de longitud y ancho de los brotes obtenidos a partir de segmentos nodales, tal como se evidencia en el cuadro 2; encontrándose un promedio de longitud de 1.64 cm por brote y 0.68 cm de ancho de hojas para yemas, y un 0.26 cm de altura y 0.12 cm de ancho de hojas en el caso de los brotes originados a partir de segmentos nodales. De ello, se puede argumentar, que tras el análisis de las variables previamente mencionadas, las yemas de *E. foetidum* permiten una mayor regeneración de plántulas con mayores longitudes de brotes y ancho de sus hojas de cilantro cimarrón vía organogénesis directa.

Por otro lado, como se muestra en la figura 2, los brotes fueron capaces de formar raíz dentro de los 30 días de cultivo de yemas, en el mismo medio de inducción, por ende reduciendo así una fase más del sistema *in vitro* concerniente a enraizamiento. Dicho resultado coincide con el encontrado por Gayatri y colaboradores (2005) quienes a los 60 días de iniciado el cultivo obtuvieron raíces en múltiples brotes de *E. foetidum* a partir de hojas, al contrario de Ignacimuthu y colaboradores (1999), quienes debieron emplear un medio de cultivo de enraizamiento para apareamiento de raíces en cilantro cimarrón a partir de hojas.

Tabla 2. Efecto de BAP, AIA y ANA en la regeneración de plantas de *E. foetidum* a partir de segmentos nodales y yemas cultivados en medio MS + suplementos. Los datos fueron analizados mediante Análisis de Varianza y test de LSD Fisher, en donde las mismas letras significan ausencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos en columnas (p<0.05).

Trat	[BAP]	[AIA]	[ANA]	Respuesta de brotación (%)		Respuesta de callo (%)		Núm brotes [explante-1]		Prom. Long brote (cm)		Prom. Ancho brotes (cm)	
	mgL ⁻¹	mgL ⁻¹	mgL ⁻¹	Seg. Nodales [†]	Yemas*	Seg. Nodales [†]	Yemas*	Seg. Nodales	Yemas	Seg. Nodales	Yemas	Seg. Nodales	Yemas
0	0	0	0	8.3	53.3	41.7	20	1a	8a	0.07a	1.7a	0.01a	0.69a
1	1.5	0	0	25	50	16.7	7.1	3a	7a	0.17a	1.59a	0.16a	0.81a
2	1.5	0.1	0	25	81.8	41.7	4.5	3a	18b,c	0.07a	2.32a	0.04a	0.91a
3	1.5	0.2	0	25	41.7	25	8.3	3a	5a	0.33a	1.05a	0.11a	0.48a
4	1	0	0	25	85.7	25	14.3	3a	18b,c	0.4a	1.22a	0.11a	0.64a
5	1	0.1	0	16.7	66.7	33.3	0	2a	10a,b	0.08a	1.35a	0.05a	0.79a
6	1	0.2	0	41.7	50	50	50	5a	7a	0.48a	1.26a	0.24a	0.47a
7	1.5	0	0.1	58.3	100	33.3	29.6	7a	27c	0.55a	2.4a	0.29a	1.02a
8	1.5	0	0.2	16.7	53.8	16.7	23.1	2a	7a	0.29a	1.83a	0.15a	0.66a
9	1	0	0.1	16.7	73.3	41.7	40	2a	11a,b	0.21a	1.65a	0.07a	0.69a
10	1	0	0.2	16.7	53.8	16.7	7.7	2a	7a	0.18a	1.71a	0.06a	0.3a
Total				25	69.1	31.1	18.8	33	125	0.26	1.64	0.12	0.68

[†] p > 0.05 en prueba chi-cuadrado

* p < 0.05 en prueba chi-cuadrado

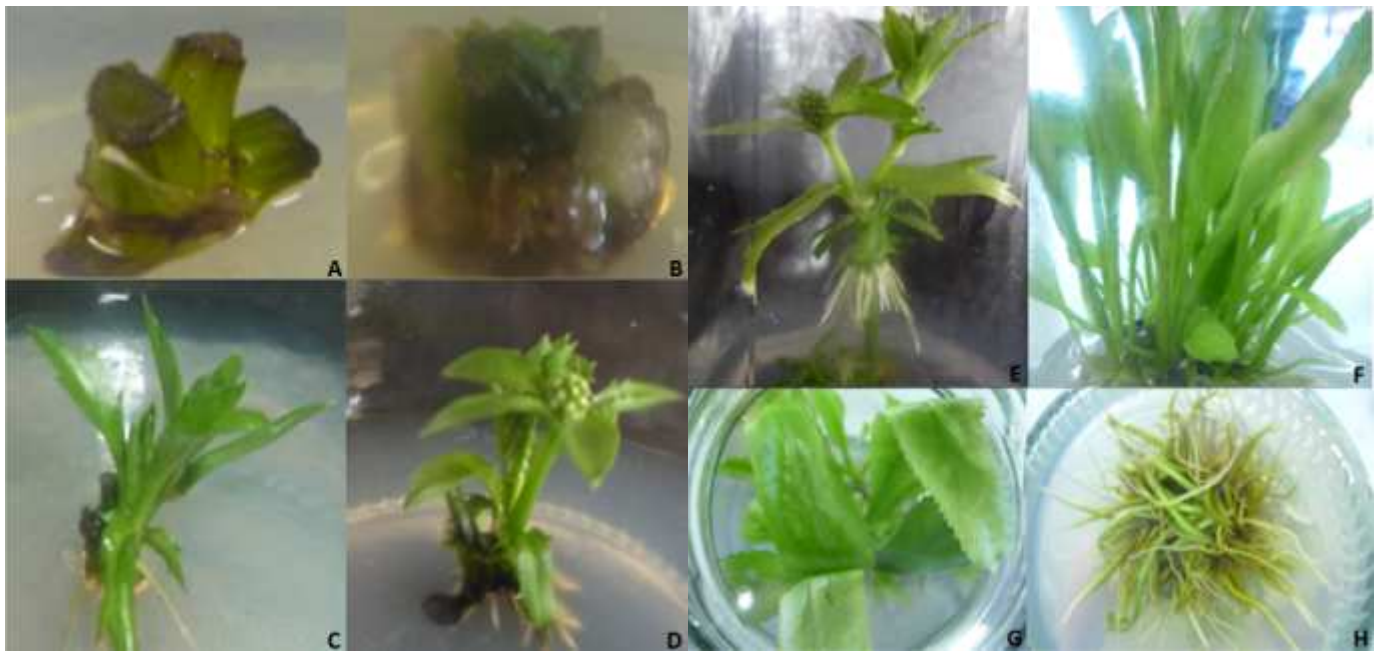


Figura 2. Regeneración *in vitro* de *Eryngium foetidum*. A) Yema axilar de cilantro cimarrón. B) Formación de callo a partir de yema. C, D) Iniciación de brotes a los 15 días de la siembra. E, F) Formación de brotes múltiples a los 30 días de la siembra. G) Hojas *in vitro* de *E. foetidum*. H) Formación *in vitro* de raíz de *E. foetidum* a los 30 días de la siembra

C. Multiplicación de brotes: método convencional y SIT

La etapa de multiplicación convencional consiste en una fase fundamental puesto que tras su realización y análisis de resultados se puede comparar los datos obtenido en cada variable con la propagación mediante sistemas de inmersión temporal.

Además, en la presente investigación, la multiplicación convencional permitió obtener un gran número de vitropiantas asegurando su inocuidad mediante la replicación por subcultivos, en los que pese a que no se evaluó la acción de

tratamientos o medios de cultivo, se obtuvo la evaluación de cada variable a ser comparada con el SIT posteriormente.

Es así que como lo señala la Tabla 3 se encontraron diferencias entre los tres subcultivos efectuados en medio sólido. Existe un mayor porcentaje de brotación en el subcultivo C (67.9%) frente al A y B que expresan un 18.2% y 36.4% respectivamente. Asimismo, se exhibe un mayor promedio de longitud de brotes y ancho de sus hojas, así como del índice de multiplicación a medida que se realizan subcultivos sucesivos, tal que, el subcultivo C expresa el mayor coeficiente de multiplicación (1.68) (Tabla 3).

Tabla 3. Respuesta de las variables evaluadas en la multiplicación convencional de brotes de *E. foetidum* en medio sólido

Método convencional	Respuesta de brotación (%)	Número de brotes	Prom. Long brote (cm)	Prom. Ancho brotes (cm)	Índice de multiplicación [†]
Subcultivo A	18.2	12	2.94	0.86	1.18a
Subcultivo B	36.4	24	3.16	1.07	1.36b
Subcultivo C	67.9	38	3.35	1.05	1.68c
Total	40.8	74	3.15	0.99	1.41

[†] letra común entre columnas no son significativamente diferentes

Para la multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal, se evaluaron las mismas variables que en la micropropagación convencional con la finalidad de, posteriormente, realizar la comparación entre los dos métodos

de cultivo. En el SIT se efectuaron dos pruebas denominadas, de parámetros del sistema y prueba de medios; en donde, primeramente, se emplearon diferentes frecuencias, tiempos de inmersión y densidades de inóculo iniciales, con la finalidad de determinar la mejor combinación de parámetros

del sistema con los que se obtenga mayor proliferación de plántulas. A continuación, se desarrolló la prueba de medios de cultivo en el SIT en la cual se ensayaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento que aumenten el desarrollo de plántulas, por ende un incremento en el índice de multiplicación. Es así que en todos los tratamientos que se encontraban en SIT la respuesta de brotación, y formación de nuevos brotes se estimuló, así como el incremento en la altura de las plantas y ancho de sus hojas con respecto a lo obtenido en el medio de cultivo sólido empleado en la multiplicación convencional (Tabla 4 y 5).

La prueba de parámetros en el SIT resultó con un porcentaje de brotación de 26.9%, por lo que se obtuvieron únicamente 142 nuevas plántulas a partir de una densidad de inóculo inicial (di) de 108 brotes (Tabla 4). Pese a que el porcentaje de brotación total de el ensayo de parámetros en el SIT es bajo, para el tratamiento 5 (inmersión=2 min, frecuencia=4 horas, di=3 explantesSIT⁻¹) se obtuvo un 100% de brotación, es decir que todos los brotes inoculados inicialmente, dieron lugar a la formación de al menos una nueva plántula. Asimismo, el promedio de longitud de las plántulas obtenidas en este ensayo en el SIT, como el ancho de las hojas corresponde a 5.74 cm y 0.99 cm respectivamente. Los intervalos de tiempo en la inmersión tuvieron un impacto significativo sobre el coeficiente de multiplicación de los brotes en el SIT. Se obtuvo una diferencia estadística mayor del índice de proliferación al emplear 2 minutos de inmersión. El mayor coeficiente de multiplicación se obtuvo al emplear una frecuencia de seis inmersiones al día, es decir frecuencia

de 4 horas (Tabla 4); además el número de brotes y longitud de las plantas mostraron un mejor desarrollo expresado en la calidad de las plantas en este tratamiento. De esta forma los intervalos de tiempo de inmersión son decisivos en los coeficientes de multiplicación, lo que concuerda con Berthouly y Ethienne (2002) quienes afirman que la frecuencia y tiempo de inmersión son los parámetros más importantes para la eficiencia en SITs al mejorar a su vez, la calidad del material vegetal.

La densidad del inóculo inicial constituye también un parámetro determinante para los análisis en el SIT, puesto que al ensayar menores densidades de inóculo, se pueden obtener mayores coeficientes de multiplicación. Característica que puede ser atribuida a una mayor disponibilidad de nutrientes y por ende mayor estimulación sobre los brotes iniciales a multiplicarse (De Fera Silva, *et. al.*, 2003). Así también Berthouly y Ethienne (2002), afirman que el movimiento de los explantes dentro de los recipientes de cultivo durante la inmersión, elimina en muchos casos la dominancia apical y podría provocar una separación de las plántulas, con lo cual se favorecería la producción de nuevas plántulas, además de un incremento en el índice de multiplicación. Es así que la densidad del inóculo de tres explantes por unidad de SIT empleados en la presente investigación, dio lugar a un incremento en el número de plántulas y el mayor índice de multiplicación de los tratamientos de la prueba de parámetros del sistema (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del tiempo, frecuencia de inmersión y densidad del inóculo sobre la respuesta de brotación y el número de plántulas de *E. foetidum* obtenidos a los 22 días de cultivo en SIT.

(Tiempo Frecuencia D. Inóculo)	Respuesta de brotación (%)*	Número de brotes	Prom. long plántula (cm) [†]	Prom. ancho hojas (cm) [†]	Índice de multiplicación [†]
1 min 4 h 3 exp	33.3	8	5.50a	0.75a	1.17a
1 min 4 h 6 exp	8.3	13	3.50a	0.60a	1.09a
1 min 6 h 3 exp	33.3	8	7.15a	1.55a	1.33a
1 min 6 h 6 exp	8.3	12	3.45a	0.65a	1.09a
2 min 4 h 3 exp	100.0	17	7.20a	1.43a	2.17b
2 min 4 h 6 exp	25.0	15	7.17a	1.07a	1.17a
2 min 6 h 3 exp	83.3	12	5.83a	1.17a	2.00b
2 min 6 h 6 exp	16.7	14	5.15a	0.50a	1.17a
3 min 4 h 3 exp	50.0	9	5.67a	0.93a	1.50a
3 min 4 h 6 exp	8.3	13	6.0a	1.00a	1.09a
3 min 6 h 3 exp	33.3	8	6.50a	1.00a	1.33a
3 min 6 h 6 exp	8.3	13	5.75a	1.25a	1.09a
Total	26.9	142	5.74	0.99	1.42

[†] letra común entre columnas no son significativamente diferentes

* p<0.05 en prueba chi-cuadrado

Una vez determinados los parámetros del sistema a emplearse en el SIT, se efectuó una prueba de medios de cultivo con una mayor concentración de reguladores de crecimiento (especialmente BAP) que permitiera la obtención de una mayor proliferación de plántulas e incrementos en el índice de multiplicación. La prueba de medios en el SIT, se efectuó empleando una frecuencia de 4 horas en tiempos de inmersión de 2 minutos y densidad inicial de inóculo de 3 brotes por SIT.

Al ensayar una concentración de 2.5 mgL⁻¹ de BAP, se obtuvo la mayor proliferación de plántulas (64) respecto al resto de tratamientos empleando una densidad de inóculo inicial de 9 brotes. Así también, este tratamiento exhibe diferencias estadísticas significativas en el índice de multiplicación, siendo éste de 7.13 (Figura 3); además de un promedio de longitud de las plántulas de 6.73 cm y promedio de ancho de sus hojas de 1.24 cm (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la concentración de BAP sobre el índice de multiplicación de plántulas de *E. foetidum* a los 22 días de cultivo

Tratamientos (mgL ⁻¹)	Respuesta de brotación (%) [*]	Número de brotes	Prom. long plántula (cm) [†]	Prom. ancho hojas (cm) [†]	Índice de multiplicación [†]
0 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	55.6	15	6.25a,b	1.17b,c	1.63a
1 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	55.6	16	5.53a	1.06a,b,c	1.80a
2 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	100	48	5.78a	0.97a,b	5.30c
2.5 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	100	64	6.73b	1.24c	7.13d
3 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	100	31	5.54a	0.83a	3.43b
Total	82.2	174	5.97	1.054	3.86

[†] letra común entre columnas no son significativamente diferentes

^{*} p<0.05 en prueba chi-cuadrado

Al comparar el Sistema de inmersión temporal con el método convencional (Tabla 6) se observó que el coeficiente de multiplicación de brotes difirió entre los dos métodos probados. En el SIT se alcanzó un promedio de coeficiente de multiplicación dos veces superior al encontrado para el método convencional. Dicha característica puede ser atribuida a lo enunciado por Preil & Hempfling (2002) que mencionan que los cultivos que se encuentran en medio de cultivo líquido, la superficie del explante entra en contacto directo lo que permite la captación más eficaz de nutrientes y la liberación de metabolitos tóxicos que pudieran acumularse en el área del tejido que se dispersa más eficientemente en el medio de cultivo líquido que en el medio sólido.

Además, respecto al coeficiente de proliferación, se obtuvo un mayor índice al emplear medios de cultivo líquido con mayores concentraciones de reguladores de crecimiento, lo que coincide con los resultados de la investigación de colmenares y colaboradores (2003) quienes mencionan que en la multiplicación *in vitro* de cormos de banano cv. Williams (*Musa*, AAA) se han obtenido índices de multiplicación de 8,4 en los SIT y de 2,4 al emplear medio sólido con 5 mgL⁻¹ de BA; mientras que para plátano hartón (*Musa*, AAB) los valores obtenidos han sido de 11,2 y 4,3 mediante SIT y en medio de cultivo sólido respectivamente; siendo así más eficiente la multiplicación por medio de SITs en medios líquidos que por el método convencional.

Tabla 6. Comparación de los dos sistemas de micropropagación empleados (multiplicación convencional y SIT) en relación a los promedios de las variables evaluadas sobre las plántulas de *E. foetidum*.

Sistema de Micropropagación	Respuesta brotación (%)	Número de brotes	Prom. long. por vitroplanta	Prom. ancho por vitroplanta	Prom. Índice de multiplicación
Medio sólido	40.8	74	3.15	0.99	1.41
Medio líquido SIT parámetros	26.9	142	5.74	0.99	1.42
Medio líquido SIT medios	82.2	174	5.97	1.05	3.86

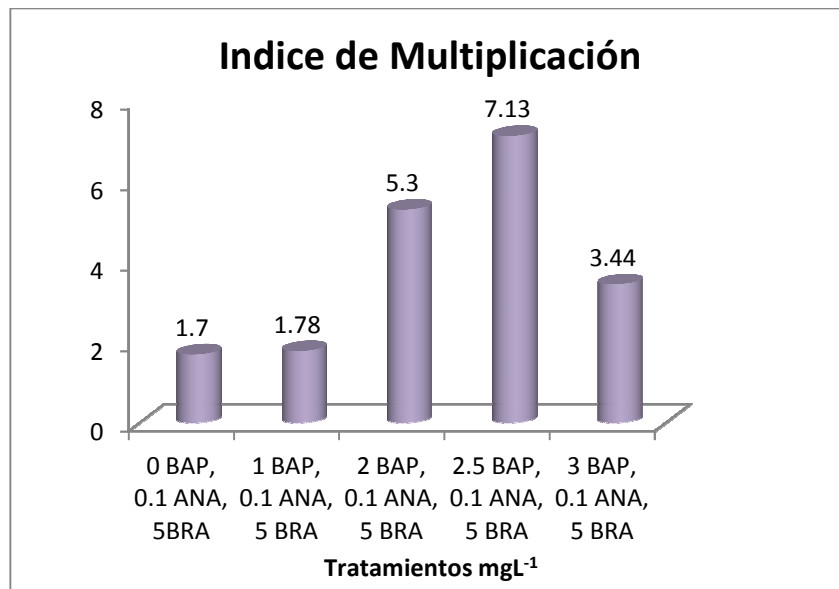


Figura 3. Índice de multiplicación obtenido en la prueba de medios del SIT al emplear diferentes concentraciones de BAP sobre las plántulas de *E. foetidum* tras 22 días de la inoculación en el SIT



Figura 4. A, C) Cortes de brotes de cilantro cimarrón provenientes del subcultivo C, previa la inoculación en el SIT. B) Proliferación de brotes en medio sólido. D) Plántula resultante del cultivo en SIT transcurridos 22 días de la siembra. E) Planta de *E. foetidum* proveniente del SIT aclimatada en sustrato.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los tratamientos de desinfección con la variación de tiempo y cloro empleados para hojas de *Eryngium foetidum* presentaron altos porcentajes de descontaminación de este tipo

de explantes siendo una concentración de 0.4% de NaClO y 6 minutos de inmersión el que permitió la obtención de todos los explantes sin contaminación fúngica o bacteriana..

Por otro lado, para yemas de cilantro cimarrón, el tratamiento con mejores resultados fue al aplicar 0.8% NaClO en un tiempo de 10 minutos, ya que concentraciones muy altas de cloro resultan en mayor oxidación fenólica, y por ende

necrosis del tejido. De esta manera, al aplicar 0.8% de cloro, se obtiene un 45.5% de explantes entre los niveles de oxidación 0 y 1 de la escala, permitiendo de esta manera una buena viabilidad de las yemas al aplicar el tratamiento indicado.

Como fue reportado en la sección anterior, cilantro cimarrón posee diversos compuestos fenólicos, por lo que tiende a oxidarse; para controlar este factor sobre los explantes se adicionó al medio de cultivo de establecimiento los antioxidantes polivinilpirrolidona (PVP) y ácido ascórbico en concentraciones 250 mgL^{-1} y 35 mgL^{-1} respectivamente, reduciendo así este tipo de exudados.

Una concentración mínima de auxinas (0.1 mgL^{-1}) permite un mayor porcentaje de brotación a partir de yemas de cilantro cimarrón en un menor tiempo. Además coadyuva al apareamiento de raíces que permiten mayor crecimiento de la planta.

En base al número de brotes y porcentaje de inducción se concluye que las yemas de cilantro cimarrón permiten la obtención de brotes organogénicos más fácilmente que segmentos nodales, por lo que para la fase de multiplicación convencional, previo a los ensayos del SIT, se sembraron únicamente yemas de *E. foetidum*.

Pese a no existir diferencias estadísticas significativas tanto de los tratamientos ensayados como de cada uno de los parámetros analizados individualmente frente a la longitud de las plántulas y ancho de sus hojas, el crecimiento longitudinal de los brotes resultantes pertenece a una mayoría de plántulas (56.4%) entre 6.15 y 8.2 cm de largo (nivel 4); mientras que para el ancho, las hojas alcanzaron de 1 a 1.5 cm (nivel 3) en un porcentaje de 41.03%.

Con el empleo de la combinación de bencilaminopurina y brasinolida del tratamiento 4, se incrementó el índice de multiplicación hasta 7.11 siendo este un coeficiente aceptable para la propagación masiva de plántulas mediante sistemas de inmersión temporal.

El SIT presenta un amplio número de ventajas al propagar plantas de interés mediante este tipo de técnica, ya que los nutrientes del medio de cultivo están más fácilmente disponibles en medios de cultivo líquido y las plántulas adquieren una mayor capacidad de absorción.

El contacto intermitente con el medio de cultivo en la superficie del explante permite un máximo crecimiento de las plántulas tras los ciclos de inmersión; considerándose así, la frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo, los tres parámetros principales y determinantes para el empleo de SITs en la propagación masiva de plantas.

ACKNOWLEDGMENT

Un agradecimiento al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y su personal. Así como a la Escuela Politécnica del Ejército por apoyar financieramente el proyecto ejecutado en el mencionado laboratorio.

REFERENCES

- [1] Arockiasamy, S. Prakash, S. Ignacimuthu, S. (2002). Direct organogenesis from mature leaf and petiole explants of *Eryngium foetidum* L. *Biologia Plantarum* 45(1): 129-132.
- [2] Berthouly, M., Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid médium in mass propagation. Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement – Amis (CIRAD – AMIS). France.
- [3] Colmenares, M. Giménez, C. (2000, Enero). Nuevas estrategias para la inducción de brotes en Musáceas. Laboratorio de Biotecnología Vegetal de La Universidad del Zulia. Venezuela.
- [4] De Fera Silva, M. Milián, M. Quiala, E. Jiménez, E. (2003). Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación in vitro de *Psidium guajava* cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* Vol. 3, No 3: 149 – 154.
- [5] Gayatri, M. Madhu, M. Kavyashree, R. Dhananjaya, S. (2006). A protocol for in vitro regeneration of *Eryngium foetidum* L. *Indian Journal of Biotechnology* 5(1): 249-251.
- [6] Ignacimuthu, S., Arockiasamy, S., Antonysamy, M., Ravichanran, P. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 56 (1999) 131 - 137
- [7] Jiménez, E. De Fera Silva, M. (1998). Empleo de biorreactores para la propagación masiva. Pérez Ponce, J. N. (Eds.), *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología* (pp207-224). Villa Clara. Cuba.
- [8] Martin, K. (2003). *In vitro* propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment. *Scientia Horticulturae* 102: 277-282
- [9] Martínez, S. Galotti, L. (2001). Las especies de *Eryngium* Sect Foetida (APIACEAE) en la Argentina. *Darwiniana* 39: (1&2), 155-169.
- [10] Pérez Ponce J. Orellana, P. Suárez, M. Valdés, C. (1998). Propagación masiva en Biofábricas. Pérez Ponce, J. N. (Eds.), *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología* (pp241-258). Villa Clara. Cuba.
- [11] Preil, W., Hvoslef-Eide, A. (Eds). (2005). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Dordrecht. The Netherlands.
- [12] Ramcharan, C. (1999). Culantro: A Much Utilized, Little Understood Herb. *Perspectives on New Crops and New Uses*. ASHS Press. 506-509.
- [13] Sistema Integrado de Información Taxonómica (2009). SIIT * América del Norte (Datos o Información como en 30-Enero -2009)
- [14] Smith, R. (2000). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Second edition. Academic Press.
- [15] Winkelmann, T. Geier, T. Preil, W. (2006). Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985–2004. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86:319–327
- [16] Yassen, M. (2002). *In vitro* regeneration, flower and plant formation from petiolar and nodal explants of culantro (*Eryngium foetidum* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38: 123-426.
- [17] Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation plants. Department of Agricultural Botany. The Hebrew University of Jerusalem. Israel.