

Determinación de condiciones operativas de biotecnología vegetal *in vitro* para la propagación del helecho *platycerium*¹

Vegetal biotechnology operative conditions determination *in vitro* for the propagation of the platycerium fern

Daniela Correa Aristizábal²
Luís Miguel Mejía Giraldo³

Recepción: Julio 27 de 2013

Aceptación: Septiembre 25 de 2013

Cómo citar este artículo: Correa A. Daniela, Mejía G. Luís M. (2013).

Determinación de condiciones operativas de biotecnología vegetal *in vitro* para la propagación del helecho *platycerium*. *UGCiencia*, Vol. (19), 95 - 107.

Resumen

Este trabajo presenta el establecimiento de las condiciones operativas del Laboratorio de Biotecnología Vegetal *in vitro*, para la propagación del helecho *Platycerium bifurcatum*, con el objetivo de realizar los protocolos necesarios para la recepción del material vegetal, desinfección del mismo, desinfección del sitio e instrumental, preparación y almacenamiento de medios, siembra y transferencia de dicho helecho; siendo un referente teórico para futuras investigaciones por parte de los estudiantes de la Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroindustrial.

Este helecho reviste importancia ya que es un referente paisajista de Colombia, y por ello, el presente trabajo gira en torno a su masificación basada en la biotecnología *in vitro* como soporte.

-
- 1 Este artículo surge de los estudios adelantados en el Grupo de Investigación para el Desarrollo Agroindustrial (GIDA) Universidad La Gran Colombia Seccional Armenia.
 - 2 Ingeniera Agroindustrial, joven investigadora, Grupo de Investigación para el Desarrollo Agroindustrial GIDA, daniela90122@hotmail.com Universidad La Gran Colombia Seccional Armenia. Avenida Bolívar No 7-46, Armenia, Quindío, Colombia.
 - 3 Ingeniero Agrónomo, Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Docente Investigador Facultad de Ingenierías Universidad La Gran Colombia, mejiagirluis@miugca.edu.co, Universidad La Gran Colombia Seccional Armenia. Avenida Bolívar No 7-46, Armenia, Quindío, Colombia.

Palabras clave

Asepsia, helecho, *in vitro*, propagación, protocolos.

Abstract

This work presents the establishment of the vegetal biotechnology lab operative conditions for the propagation of the *Platyterium bifurcatum* fern to the purpose of carrying out the necessary protocols for the reception of vegetal materials: thereof disinfection, instruments and location disinfection, preparation and storage of media, fern seedtime and transfer. This has become a theoretical reference for future researches made by the engineering faculty students especially the agro industrial engineering students.

Key words

Asepsis, fern, *in vitro*, propagation, protocols.

Introducción

El artículo está enfocado en el desarrollo de un protocolo para determinar las condiciones operativas de Laboratorio de Biotecnología Vegetal *in vitro*, en la Universidad La Gran Colombia Seccional Armenia, con miras a establecer la propagación del helecho *Platyterium bifurcatum*.

El estudio gira en torno a aspectos como la recepción del material, desinfección de los tejidos, el instrumental, preparación de medios, seguimiento y control de crecimiento del helecho objeto de estudio, conllevando a la definición y formulación de protocolos soportados en la germinación simbiótica de este material vegetal, desde la recepción hasta la propagación de las esporas en su estado inicial de siembra hasta la transferencia.

Los procesos *in vitro* tienen una alta importancia dado que se requiere de la implementación de protocolos acordes con las condiciones del mismo, desde la recepción de materiales hasta su posterior fase de desarrollo y propagación. Por eso se hace necesario definir los parámetros para la producción, propagación y establecimiento de fundamentos investigativos, para consolidar las dinámicas de investigación y desarrollo (I+D) agrícola.

Materiales y métodos

Este proyecto es desarrollado de manera descriptiva y experimental, realizando los protocolos establecidos en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal *in vitro* de la Universidad La Gran Colombia Seccional Armenia,

donde se determinan las fases a seguir para la consolidación de protocolos de propagación teniendo en cuenta parámetros como la humedad relativa y la temperatura que presenta la zona *in vitro* del laboratorio, entre otros aspectos.

Dentro de los factores relevantes están presentes los reguladores de crecimiento que se utilizan como son las auxinas y las citoquininas. La fuente principal de auxina fue Aloe vera así como lo desarrollaron Matos y Sánchez (2011), mientras que la fuente de citoquinina fue el BAP (Bencilaminopurina). Por otro lado, se utiliza el fungicida y bactericida Agrodine.

Se usó como medio estadístico un diseño en arreglo factorial 2^3 (2 niveles de tres factores) y se realizan ocho tratamientos para el proceso de siembra del helecho *Platyserium bifurcatum*.

Resultados

Condiciones básicas para la recepción del material y la siembra

Para la recepción de material vegetal es fundamental determinar las condiciones óptimas de producción y propagación *in vitro* en el laboratorio, es decir, que las condiciones de manejo no son aspectos que se puedan universalizar o generalizar, y por ello, es menester definir los criterios y los parámetros de expansión para zonas específicas, como es el caso del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad la Gran Colombia, el cual posee condiciones ambientales promedio de humedad relativa del 65% y una temperatura al interior de 25°. Estos factores pueden favorecer la propagación de hongos y otros patógenos, así como generar efectos de contaminación cruzada que se pueden ver evidenciados en los medios de cultivo. Por ello, se hace necesario definir todos y cada uno de los pasos a seguir dentro de los protocolos para la condición específica del laboratorio en mención.

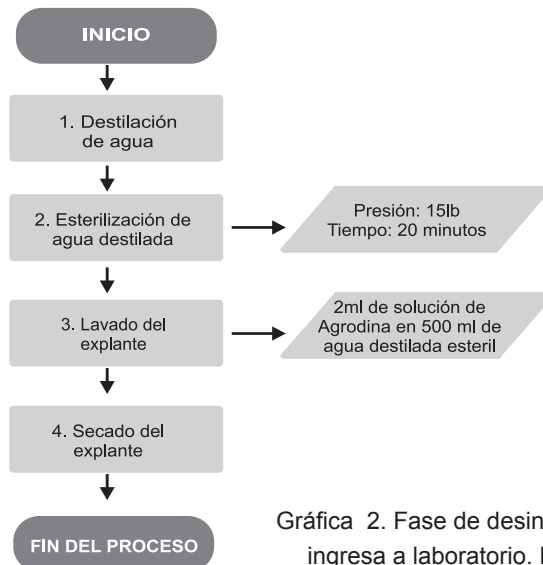
La recepción es la fase donde ingresa material vegetal vivo a laboratorio para efectos de propagación de células *in vitro*, para ello se deben tener en cuenta una serie de criterios y un proceso, partiendo desde la ubicación de la planta, la evaluación del estado fitosanitario del material, así como el almacenamiento del material en condiciones de refrigeración de ser necesario con base en la capacidad instalada del laboratorio como se puede observar en la gráfica:



Gráfica 1. Fase de recepción del material vegetal. Fuente: Los autores

La desinfección de tejidos es la fase donde el material vegetativo es sometido a un tratamiento con bactericidas y fungicidas para obtener un explante (material de siembra) libre de hongos y bacterias los cuales pueden crecer en cualquier etapa del proceso (Gráfica 2).

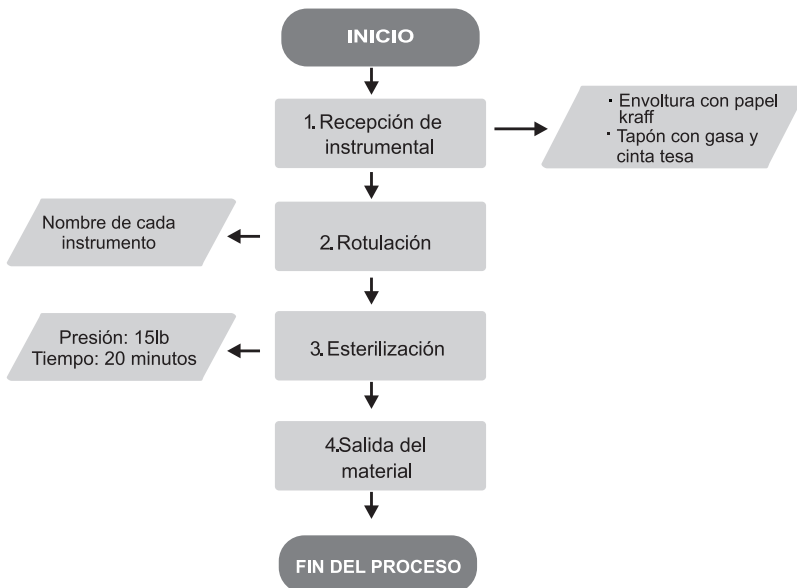
Esta fase reviste importancia debido a que los problemas de contaminación en fase inicial de siembra en cultivo *in vitro* suelen provenir de material infectado traído del campo.



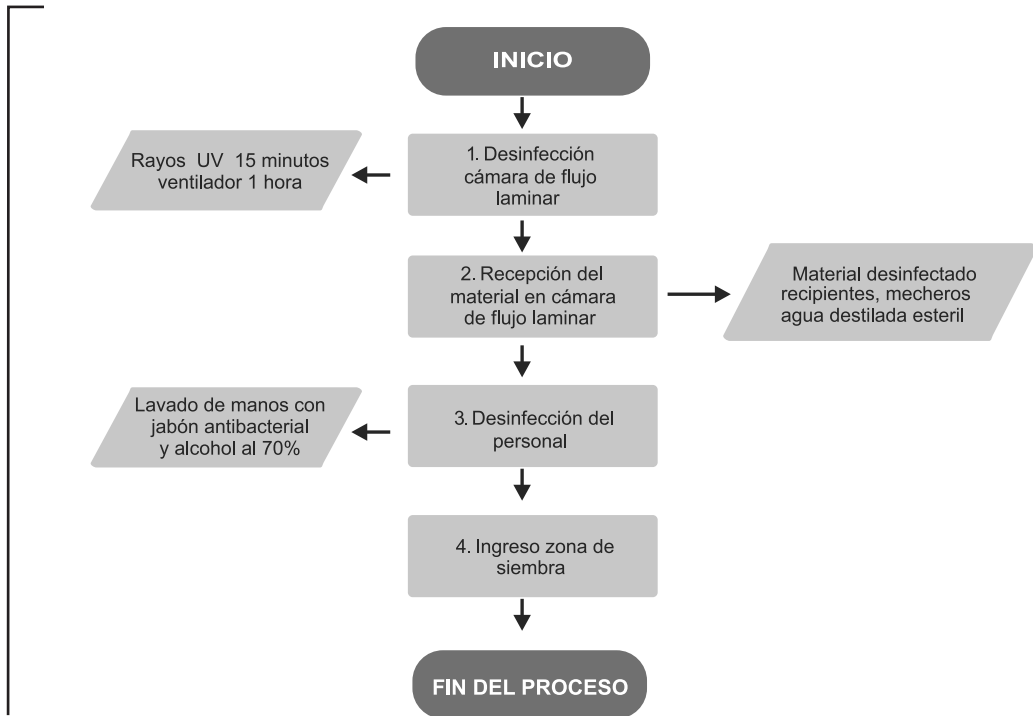
Gráfica 2. Fase de desinfección de material que ingresa a laboratorio. Fuente: Los autores

La desinfección de instrumental es la fase en la cual todos los utensilios utilizados para la propagación *in vitro* son sometidos a un proceso de esterilización. Para esto debe tenerse en cuenta la temperatura, el tiempo y la presión de la autoclave, así como las condiciones de asepsia del laboratorio, donde es fundamental evitar efectos de contaminación por agentes externos.

Esta fase implica otros procedimientos como son la rotulación de material a esterilizar, fechas de esterilización y almacenamiento de material esterilizado en aras de mantener el control al interior del laboratorio (Gráfica 3).



Gráfica 3. Fase de desinfección de material. Fuente: Los autores

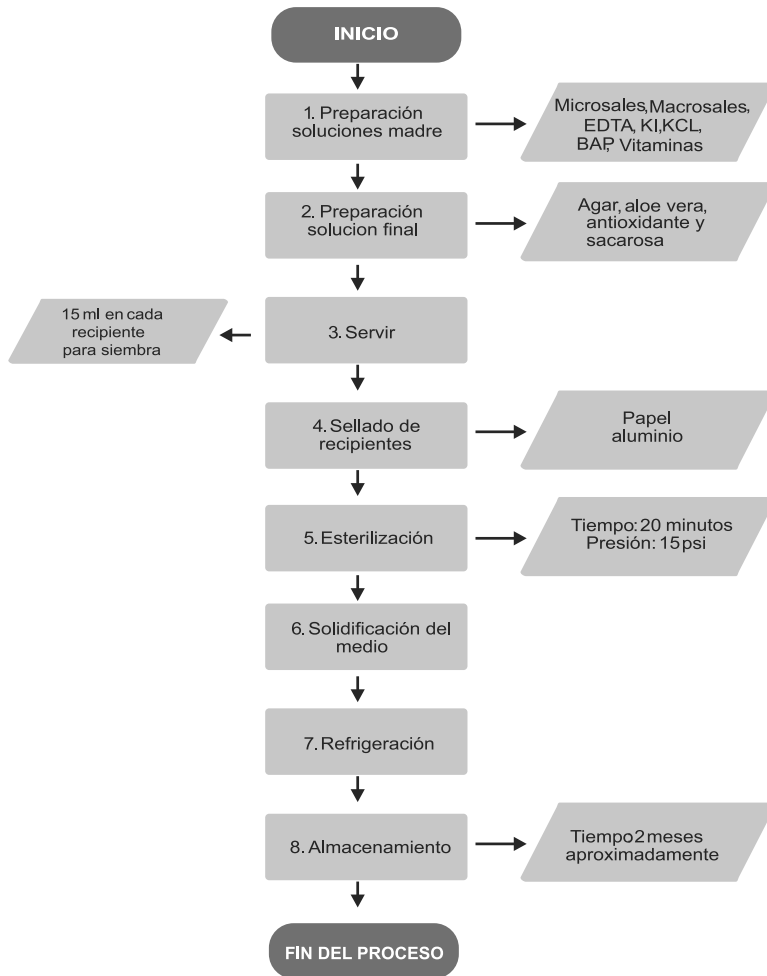


Gráfica 4. Fase de ingreso a cámara .Fuente: Los autores

En la fase de ingreso a cámara (Gráfica 4) se lleva a cabo el manejo de asepsia del personal que realiza la práctica de siembra, lo cual exige lavado de manos, uso de ropa estéril, preparación del sitio de siembra (cámara de flujo laminar) y el ingreso al sitio de siembra en condición óptima para evitar contaminación por agentes exógenos ajenos al material vegetal.

Diseño del proceso operativo de preparación de medios de cultivo y almacenamiento de las mismas

La preparación de medios de cultivo es la fase donde se obtiene el medio MS (Morashige y Skoog) el cual tiene los nutrientes necesarios para que las esporas del helecho realicen sus etapas de crecimiento *in vitro* de manera óptima (Gráfica 5).

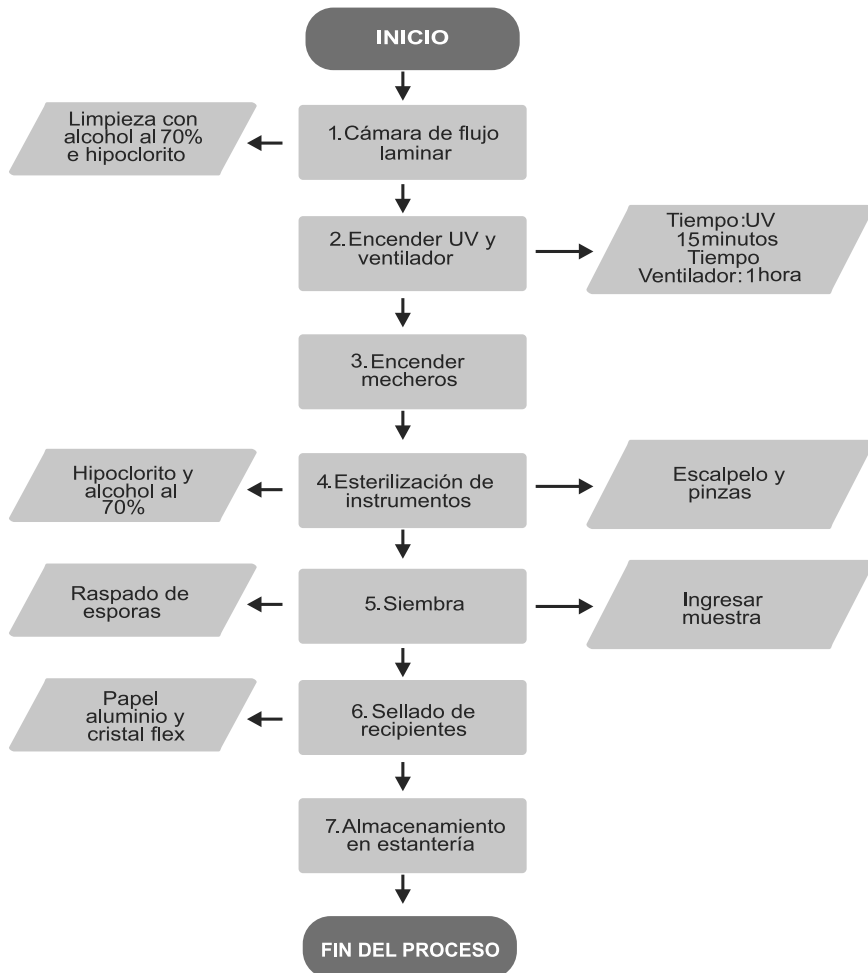


Gráfica 5. Proceso de preparación de medios de cultivo para siembra de tejidos vegetales. Fuente: Los autores

Esta fase implica el manejo adecuado de fitorreguladores, hormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas), así como de otras sustancias con el fin de consolidar las condiciones óptimas para la caulogénesis (formación de callo con células del helecho) y promover la dediferenciación como tal, en el proceso de cultivo de los tejidos.

Establecimiento del proceso de siembra de *platycerium bifurcatum* bajo condiciones de laboratorio *in vitro*

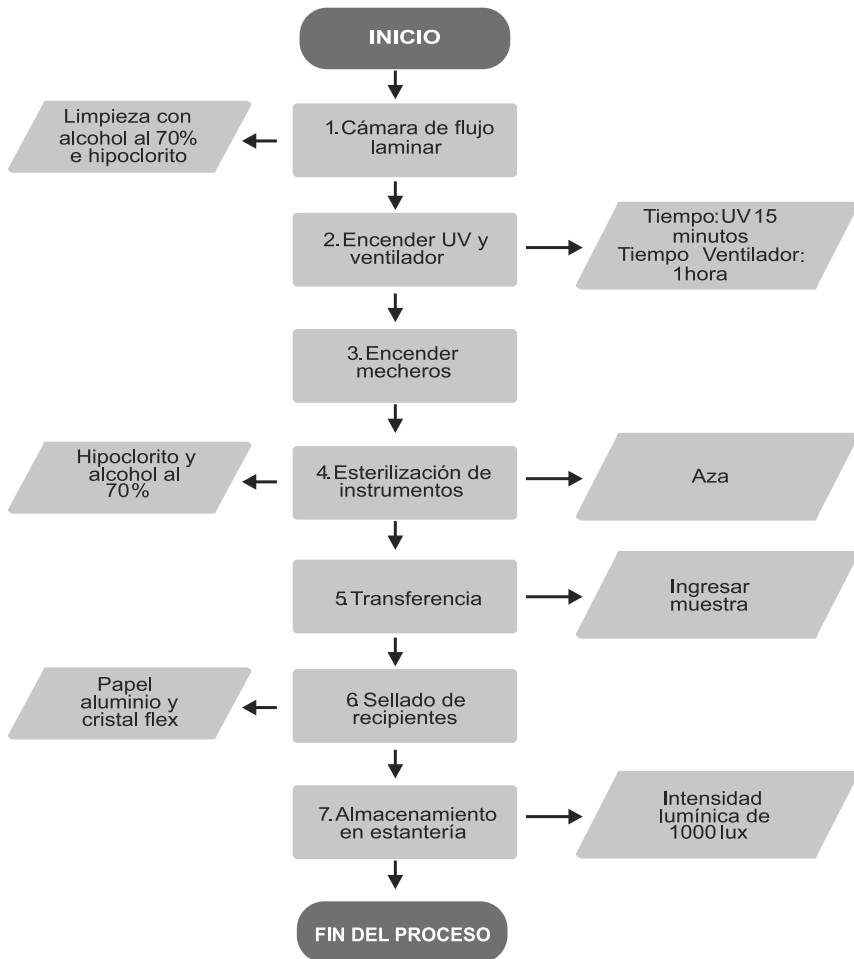
Es la fase donde se incorporan las esporas al medio de cultivo MS, deben tenerse en cuenta los procedimientos descritos en los diagramas anteriores y realizar esta fase teniendo en cuenta el Gráfico 6. Para este proceso se realiza el aislamiento de tejidos a sembrar bajo condiciones de control al interior de cámara de flujo laminar e implica la siembra de los mismos en los medios de cultivos, la rotulación de frascos donde han sido sembrados y manejo fundamental de campo estéril al momento de extraer el tejido y ser llevado al medio como tal.



Gráfica 6: Fase de siembra. Fuente: Los autores

Proceso de transferencia de *Platyserium bifurcatum* bajo condiciones de laboratorio *in vitro*

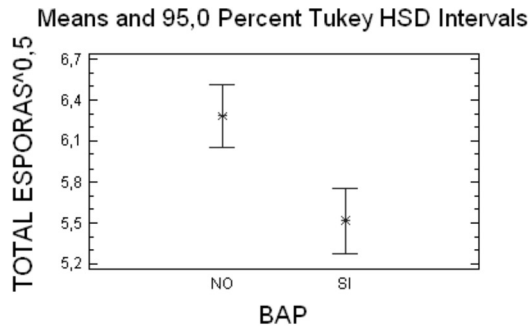
La transferencia es el proceso en el cual los tejidos que han sido sembrados son llevados a un nuevo medio de cultivo MS (Morashige y Skoog), este medio se prepara utilizando los mismos protocolos descritos para la siembra, debido al envejecimiento del medio de siembra, lo cual puede afectar la formación de callos y nuevos brotes del material vegetal (Gráfica 7).



Gráfica 7 Fase de transferencia de tejidos. Fuente: Los autores

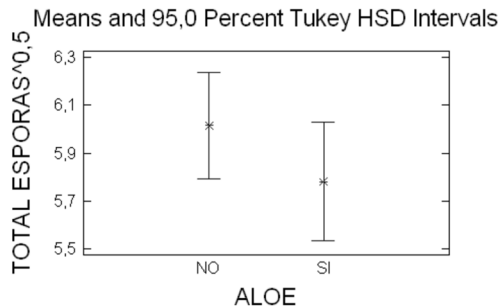
Análisis estadístico del proceso de siembra y transferencia de esporas en proceso de germinación

Análisis del número total de esporas



Gráfica 8. Análisis del número total de esporas en función de Bencilaminopurina (BAP). Fuente: Los autores

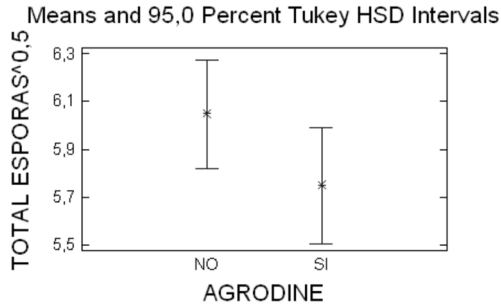
Para la variable total de esporas (gráfica 8) se aprecia efecto altamente significativo por parte del BAP, sin embargo, hay un efecto no significativo del *Aloe vera* ni el Agrodine en el estímulo de los mismos. A su vez, cuando se miran las interacciones de primer orden así como las de segundo no se aprecia efecto significativo alguno, es decir, el BAP es el único en este caso que ejerce impacto sobre el desarrollo de las esporas en condiciones *in vitro*.



Gráfica 9. Análisis del número total de esporas en función de Aloe (de auxina). Fuente: Los autores

Se aprecia además que el número total de esporas establecidas es mayor en aquellos medios sin Aloe que en los medios que lo tienen (gráfica 9), lo cual corrobora lo afirmado por Evangelista *et al* (2012), donde este

ejerce un efecto deletéreo sobre el estímulo de las esporas, no obstante, la diferencia a nivel estocástico no es significativa.



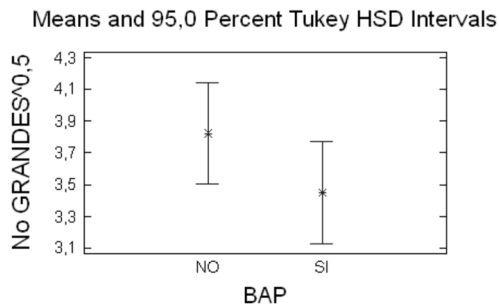
Gráfica 10. Análisis del número total de esporas en función de Agrodine.

Fuente: Los autores

Las pruebas comparativas con la prueba comparativa de Tukey se aprecia que el Agrodine no ejerce influencia significativa alguna (gráfica 10), esto indica entonces que la reproducción de esporas puede hacerse ya sea con o sin este o con o sin *Aloe vera*, pero es fundamental el no uso del BAP.

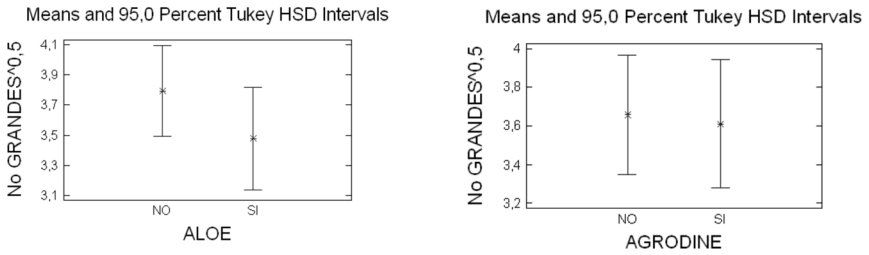
Análisis del número de esporas con comportamiento de desarrollo plantural inicial

Cuando se evalúa el número de esporas desarrolladas que son aquellas con 1 mm de diámetro, se aprecia que ninguna de las fuentes utilizadas ejerce efecto significativo alguno, así como ninguna de sus interacciones, no obstante, hay una ligera diferencia donde son mayores las esporas grandes sin BAP que con este, lo que es no significativo (Gráfica 11). Sin embargo, se denota que las esporas estimuladas no requieren de estos tres medios desde el punto de vista estadístico y esto se puede apreciar en las diferentes pruebas de comparación (gráfica 12).



Gráfica 11. Análisis del número de esporas grandes en función de Agrodine.

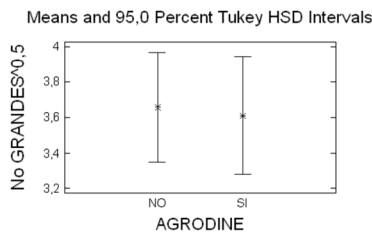
Fuente: Los autores



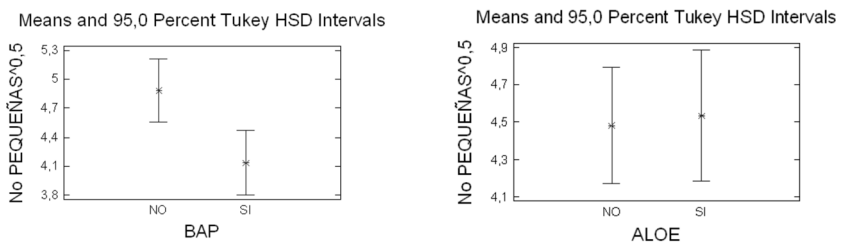
Gráfica 12. Análisis del número de esporas grandes en función de Aloe (de Auxina) y Agrodine. Fuente: Los autores

Análisis del número de esporas con comportamiento de potencial germinativo tardío (esporas pequeñas)

El número de esporas pequeñas sufren un efecto significativo por parte del BAP (Gráfica 13) mas no de los otros medios (Gráfica 14), donde aquellas sin BAP es donde hay mayor cantidad de estas esporas pequeñas, mientras que aquellas con este tienen menor cuantía de estas; teniendo en cuenta que una espora pequeña posee un diámetro menor a 1 mm pero que presenta viabilidad. Finalmente, se aprecia esto en sus respectivas pruebas de comparación donde se denota que en ninguno de los casos tanto el *Aloe vera* como el Agrodine influyen.



Gráfica 13. Análisis del número de esporas pequeñas en función de BAP. Fuente: Los autores



Gráfica 14. Análisis del número de esporas pequeñas en función de BAP. Fuente: Los autores

El crecimiento y desarrollo de las esporas se presenta debido al medio de cultivo utilizado, el cual tiene los nutrientes necesarios para realizar su ciclo vegetativo *in vitro*. Las dosis utilizadas en las soluciones madre del medio Murashige y Skoog fueron aptas para el crecimiento de las esporas del *Platycterium bifurcatum*.

Conclusiones

- Para evitar la contaminación por hongos y bacterias en la recepción del material, deben tenerse en cuenta las condiciones de humedad relativa y temperatura del sitio donde se va a realizar la propagación *in vitro*.
- Se aprecia que el BAP ejerce un efecto significativo deletéreo sobre el desarrollo y estímulo de las esporas del *Platycterium*.
- El Aloe vera y el Agrodine no ejercen efecto significativo, es decir, que se pueden utilizar medios de propagación *in vitro* para el *Platycterium bifurcatum* sin necesidad de utilizar estas soluciones.
- El desarrollo de las esporas de mayor tamaño no sufre efecto significativo en ninguno de los medios, sin embargo, se aprecia un promedio mayor en aquellas sin BAP que con este.
- Se denota que los componentes de la propagación *in vitro* de esporas de *Platycterium* están más asociados a manejos adecuados de asepsia de preparación de medios y de condiciones de esterilización en general de los laboratorios más que de manejo *in vitro* del material como tal.
- Se aprecia a su vez que las esporas de *Platycterium bifurcatum* bajo condiciones de *in vitro* presentan una alta viabilidad de germinación.

Referencias bibliográficas

- Evangelista S, Escobar S, Trejo G y Jiménez A. (2012). Propagación *in vitro* de *Platycterium bifurcatum*. Centro de desarrollo de productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Colonia San Isidro; Yautupe, Morelos. México.
- Guía legislativa y normativa para empresas de biocomercio sostenible. (2003). Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt.
- Matos, A; Sánchez, A (2011). Evaluación de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en Aloe vera L. En *Multiciencias*, Vol. 11, N° 1, 2011 (7 - 14) ISSN 1317-2255.