



Propagación *in vitro* de la hortensia (*Hydrangea macrophylla* thunb. Ex J.A.Murr. Ser) para la producción de esquejes

Hydrangea (*Hydrangea Macrophylla* (Thunb. Ex J.A.Murr. Ser) *in vitro* propagation for scion production

Jesús Jáiber Díaz García*, Rafael Navarro Alzate**, Bertha Myriam Gaviria Gutiérrez***, Ximena Jurado Betancur**** y Marta Lucía Cardona Ochoa****.

Resumen

Se desarrolló un protocolo para la micropropagación clonal de la hortensia (*Hydrangea macrophylla*) en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente, para ello se evaluaron las fases de establecimiento, proliferación y enraizamiento. En la fase de establecimiento los mejores resultados en cuanto a porcentaje de yemas *in vitro* sin contaminación (66%), se lograron cuando éstas fueron sometidas a la desinfección con hipoclorito de sodio al 1% por un periodo de 10 minutos. En la fase de proliferación se determinó que los mejores coeficientes se obtuvieron cuando se adicionaron al medio de cultivo 3 mg L⁻¹ de Bencil Amino Purina (BAP) en combinación con 0,5 mg L⁻¹ de Ácido Indolbutírico (AIB), lo que dio como resultado dos brotes por frasco. En la fase de elongación de los brotes se estableció que mediante la utilización del medio de cultivo MS enriquecido con 3 mg L⁻¹ de BAP en combinación con 0,5 mg L⁻¹ de AIB, el promedio de altura de los brotes fue de 0,78 centímetros. Para mejorar la calidad de los brotes durante la fase de elongación *in vitro* de *Hydrangea macrophylla* se sometieron los brotes proliferados *in vitro* a distintos periodos de oscuridad para estimular la elongación y obtener así plantas competentes para la fase de enraizamiento. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los brotes se sometieron a periodos de oscuridad entre 3-4 semanas. En la fase de enraizamiento de los brotes se estableció que cuando se adicionó al medio de cultivo 0,825 mg L⁻¹ de nitrato de amonio sin Ácido Indolbutírico se logró el mejor resultado con un porcentaje de enraizamiento del 99%.

Palabras clave: hortensia, micropropagación, explantes, desinfección, BAP, ANA, AIB.

* M.Sc. Asistente de investigación. Unidad de Biotecnología Vegetal. Universidad Católica de Oriente. A.A. 008 Rionegro (Antioquia), Colombia. E-mail: jdiaz@uco.edu.co

** M.Sc. Grupo de investigación de Sanidad Vegetal. Universidad Católica de Oriente. A.A. 008 Rionegro (Antioquia), Colombia. E-mail: sanidadveg.inv1@uco.edu.co

*** Ph.D Grupo de investigación de Sanidad Vegetal. Universidad Católica de Oriente. A.A. 008 Rionegro (Antioquia), Colombia. E-mail: sanidadveg.inv2@uco.edu.co

**** Egresadas Agrónomas - Zootecnistas. Universidad Católica de Oriente.

Abstract

A new protocol for clonal micropropagation of hydrangea (*Hydrangea macrophylla*) was developed in the Plant Biotechnology Laboratory at Universidad Católica de Oriente. With improving the propagation process as its main goal, the phases of establishment, proliferation, elongation and rooting were carried out. During the establishing phase, percentage contamination of *in vitro* buds showed the best results using disinfection with 1% sodium hypochlorite for 10 minutes. In the proliferation phase the best coefficients appeared after the media being supplemented with Bencil Amino Purine (BAP), 0.5 mg L⁻¹ Indol Butilic Acid (AIB), showing two shoots by flask. In the elongation phase, shoot average height obtained was 0.78 centimeters, using a MS media culture supplemented with 3 mg L⁻¹ of BAP in combination with 0.5 mg L⁻¹ AIB. To enhance the quality of the shoots during *Hydrangea macrophylla* *in vitro* elongation, the proliferated shoots were placed in darkness to stimulate elongation and obtain competent plants for the rooting phase. The best results were obtained when the shoots were placed in darkness for 3-4 weeks. During shoot rooting the best result was obtained when 0.825 mg L⁻¹ of Ammonium Nitrate without IBA was added to the culture media, getting a rooting percentage of 99%.

Key words: *hydrangea*, micropropagation, explants, disinfection, BAP, ANA, AIB.

Introducción

El cultivo de la hortensia (*Hydrangea macrophylla*) es uno de los de mayor importancia para el Oriente Antioqueño por su demanda en los mercados externos. El área sembrada se estima en 234 hectáreas, y aunque se observa un incremento continuo en el área de siembra, en la región no se dispone de material certificado que garantice la calidad fitosanitaria e identidad del clon o variedad para cultivar. Colombia ocupa, después de Holanda, el segundo lugar en el mercado mundial de las flores, por lo tanto, se puede mirar con confianza el futuro desarrollo de las exportaciones de flores colombianas tanto hacia Norteamérica como hacia Europa occidental (Ossa, 2006; Llorente, 2007).

La multiplicación vegetativa es la forma de propagación más utilizada para el cultivo de la hortensia, ya que las estacas y esquejes enraízan y brotan fácilmente, siempre y cuando cuenten con humedad, temperatura y luminosidad adecuadas, además, este tipo de propagación garantiza la uniformidad genética de las plantaciones. Sin embargo, como método no convencional en los últimos 10 años, se descubrió que las plantas pueden ser clonadas más rápidamente mediante técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Ésta es una

de las herramientas que permite propagar plantas seleccionadas por sus características fenotípicas, como color, longitud de tallo, tamaño de la cabeza y limpieza fitosanitaria (Sagasta, 1990; Arango, 2003; Barbat, 2006; López y Carazo, 2005).

La micropropagación es una técnica desarrollada para la producción en masa de plantas, que ha sido usada con éxito desde la década de 1960. Una de sus ventajas es la multiplicación rápida de material clonal libre de enfermedades, aspecto que ha servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante programas de selección. El sector de plantas ornamentales es el que mayor desarrollo ha tenido en este campo (Holdgate y Zandvoort, 1992, citados por Cañal et al., 1999).

Con el cultivo de la hortensia se han desarrollado pocos trabajos, sin embargo Sebastian y Heurser (1987) reportan la siembra de yemas de *H. quercifolia* sobre medios de cultivo MS en condiciones *in vitro* con 10 µm de Benziladenine, Zeatina y 2- isopentenyl adenina, para el estudio de diferenciación de callos a hojas y proliferación de brotes axilares; ellos obtuvieron buenos resultados pero publicaron muy pocos datos, ya que omiten muchos detalles acerca de la micropropagación de esta especie. Abou Dahab

(2007), en la Universidad del Cairo, desarrolló un protocolo para la micropropagación comercial usando explantes maduros de *H. macrophylla*. La presente investigación permitió desarrollar las técnicas de propagación clonal de la hortensia (*H. macrophylla*), para la multiplicación de materiales con características superiores, mediante la determinación de factores críticos ambientales y nutricionales que afectan las fases *in vitro* de establecimiento, proliferación, elongación de brotes y enraizamiento de la especie, libre del virus Tomato Spotted Wilt Virus -TSWV-.

Metodología

El proceso de micropropagación se desarrolló en el laboratorio e invernadero de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente, ubicada en el municipio de Rionegro, Antioquia.

Se utilizaron yemas de hortensia variedades blanca y azul, procedentes de las plantas madre seleccionadas en el cultivo de hortensia Flores del Este, localizado en el municipio de La Ceja, vereda Las Lomitas, km 3, el cual se encuentra a 2.100 m.s.n.m y con una precipitación de 2.300 mm. Para la selección de las plantas se tuvieron en cuenta algunas características agronómicas, como la longitud del tallo, el color de la flor, el tamaño de la cabeza, y que además fueran plantas que no presentaran manchas negras en los tallos ni síntomas de virosis.

En la fase de pre-acondicionamiento se tomaron tallos de las plantas madre seleccionadas, se establecieron en bancos de enraizamiento y se les aplicaron fungicidas para eliminar contaminación y favorecer así el establecimiento de las yemas *in vitro*.

Para determinar la presencia del virus (TSWV) se utilizaron muestras frescas tanto de plantas madre como de brotes jóvenes de plantas *in vitro* que se encontraban en la fase de endurecimiento (esquejes) y tejidos en medios de cultivo *in vitro*.

Se tomaron tejidos de hojas, tallos y raíces de las plántulas, finamente fraccionadas y maceradas en tampón de extracción, siguiendo el protocolo establecido para la técnica de ELISA del kit de AGDIA (2008).

Para la fase de establecimiento *in vitro* se tomaron yemas de las plantas madre seleccionadas, se hizo la desinfección de los explantes (yemas), inicialmente con un lavado en yodo (1 mL L^{-1}) durante tres minutos; posteriormente, en condiciones de total asepsia, se procedió a realizar la desinfección, que consistió en una inmersión en etanol al 70% durante dos minutos, para luego someterlos a una segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 1%, en la cual se evaluaron cuatro tiempos de inmersión: 3, 5, 10 y 15 minutos. Después de realizados los tratamientos de desinfección, los brotes se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se procedió al aislamiento de las yemas. La siembra de los explantes se llevó a cabo en el medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962), al cual se adicionaron las vitaminas MS, sacarosa 30 g L^{-1} , la citoquinina Bencil Amino Purina (BAP) $0,5 \text{ mg/L}$ y agar culture gel ($2,4 \text{ g L}^{-1}$). El pH se ajustó a $5,8 \pm 0,1$; los explantes se incubaron durante una semana en condiciones de completa oscuridad. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar en el que los tratamientos correspondieron a los tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio, con 30 repeticiones por tratamiento. Se evaluaron las variables: porcentaje de contaminación causada por hongos y bacterias, porcentaje de supervivencia y porcentaje de oxidación.

Con el propósito de lograr la proliferación de los brotes se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de BAP: 0, 1, 3 y 5 mg L^{-1} , en combinación con Ácido Indolbutírico (AIB) en concentraciones de 0, 0,5 y 1 mg L^{-1} . El medio de cultivo para esta fase estuvo compuesto por las sales MS, suplementado con las vitaminas MS $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, sacarosa 30 g L^{-1} y agar culture

gel ($2,4 \text{ gL}^{-1}$). El pH se ajustó a 5.8 ± 0.1 . Los brotes se incubaron con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad; en esta fase de proliferación se empleó un experimento bifactorial completamente aleatorio con tres repeticiones y diez unidades experimentales por cada tratamiento. Las variables que se evaluaron correspondieron a coeficiente de multiplicación y altura de los brotes.

Para mejorar la calidad de los brotes previos a la fase de enraizamiento se evaluaron períodos de oscuridad de 1, 2, 3 y 4 semanas. Se empleó un experimento completamente al azar con 30 repeticiones. Para efectuar el enraizamiento de los brotes se evaluaron distintas concentraciones de nitrato de amonio (NH_4NO_3) correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100%, a partir de la concentración utilizada convencionalmente de 1,65 gramos/litro; en combinación con AIB 0, 0,5 y 1,0 mg L^{-1} , se empleó un experimento bifactorial en diseño completo al azar con 10 unidades experimentales, cada unidad constituida por 5 brotes y 3 repeticiones. Los brotes se incubaron con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Una vez se observó formación de raíces, las plántulas se trasladaron al invernadero para la fase de aclimatación o endurecimiento, la cual se realizó en condiciones de cámara húmeda en bandejas semilleras, utilizando como sustrato turba y arena en relación 1:1.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis descriptivos e inferencial mediante análisis de varianza simple y la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparación de medias. Para el procesamiento estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus. Versión 5.0 de 2000.

Resultados y discusión

Los resultados de las pruebas serológicas para TSWV hechas con material fresco de plantas madre, brotes jóvenes de plantas *in vitro* que se encontraban en la fase de endurecimiento (esquejes), y material vegetal en medios de cultivo *in vitro*, presentaron reacción negativa para este virus, lo cual permitió continuar con el proceso de micropropagación y garantizar la producción de material de siembra de hortensia libre de virus (figura 1).



Figura 1. Obtención de tejido fresco para detección de TSWV mediante Test de ELISA. A, Plantas madre; B, Tejidos *in vitro*; C, esquejes de plantas *in vitro*; D, proceso para determinación de virus

Establecimiento de material juvenil

Las plantas madre seleccionadas fueron revigorizadas mediante enraizamiento de estacas y esquejes, y se mantuvieron bajo condiciones controladas de invernadero, donde se hizo acondicionamiento sanitario mediante aspersio-

nes con un producto fungicida (Benomil, $0,5 \text{ gL}^{-1}$), para minimizar los riesgos de contaminación una vez fueran sembradas en condiciones *in vitro*. Esto permitió además disponer todo el tiempo de explantes suficientes para la introducción en el laboratorio. Luego de realizar los chequeos

serológicos con el Kit AGDIA, se procedió a la siembra de los explantes que fueron negativos ante la presencia de TSWV.

Al evaluar los tratamientos de desinfección se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. En la figura 2 se puede apreciar que los mejores resultados en cuanto a porcentaje de yemas establecidas *in vitro* sin contaminación causada por hongos o bacterias, se lograron cuando las yemas fueron sometidas a la desinfección con hipoclorito de sodio al 1% por un período de 10 minutos, correspondiente al 66%

de prendimiento. Se evidenció que esta especie no presenta problemas de oxidación cuando se cultivan en condiciones *in vitro*. Investigaciones realizadas por Abou Dahab (2007) reportan porcentajes del 100% de prendimiento de yemas sin contaminación, al utilizar clorox al 50% más cloruro de mercurio al 0,2%; Cassells y Tahmatsidou (1996) reportan porcentajes de contaminación del 69% causada por bacterias en explantes de *Hydrangea*. En el presente estudio la principal causa de contaminación también fueron bacterias.

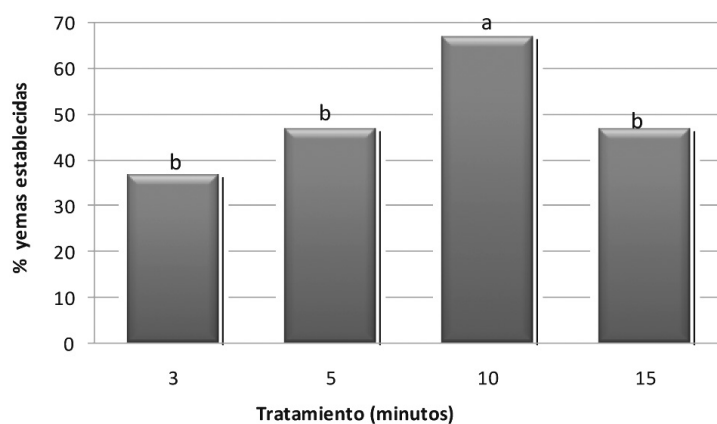


Figura 2. Establecimiento de explantes de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) procedentes de plantas madres seleccionadas. Los datos representan la media de 30 repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para $p < 0.05$ por el test de Duncan.

Evaluación del efecto de distintas concentraciones de BAP en la fase de proliferación

De acuerdo con los resultados que se presentan en la tabla 3, el coeficiente de multiplicación mostró interacción entre los factores evaluados y se encontró que las concentraciones entre 1 y 3 mg L⁻¹ de BAP sin la auxina AIB presentaron las mejores proliferaciones (1,8 a 2 brotes/explante); de igual manera, la combinación de

5 mg L⁻¹ de BAP con 0,5 mg/L de AIB tuvo un comportamiento similar a los anteriores tratamientos. Respecto a la altura de los brotes, se observó que las mayores concentraciones de AIB (1 mg L⁻¹) tendieron a disminuir la altura de los brotes en relación con los otros tratamientos, aunque estadísticamente no presentan diferencias significativas. Por lo tanto, como mejor tratamiento puede utilizarse 1 mg L⁻¹ de BAP sin Ácido Indolbutírico.

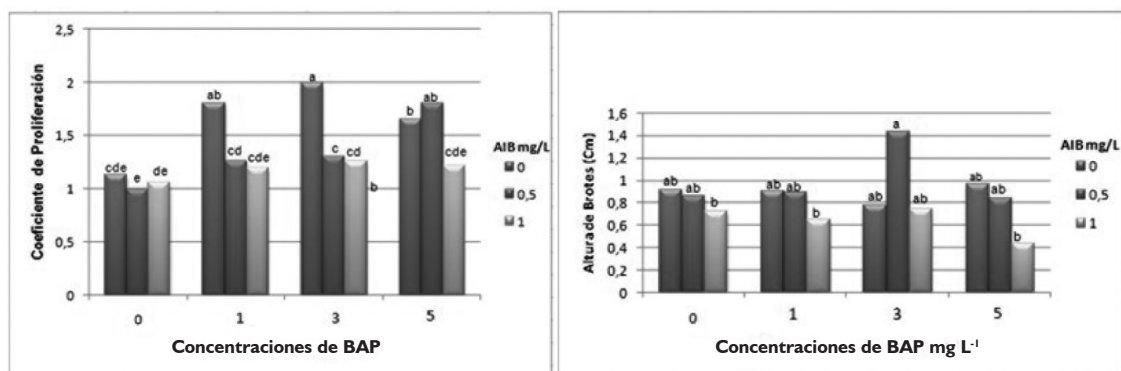


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de BAP en combinación con diferentes concentraciones de AIB sobre el coeficiente de proliferación y la altura de brotes de la hortensia (*Hydrangea macrophylla*). Los datos representan la media de 30 repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para $p < 0.05$ por el test de Duncan.

Trabajos realizados en hortensia por Abou Dahab (2007) reportan los mejores resultados en proliferación de brotes cuando utilizaron el medio Murashige and Skoog (MS), suplementado con 2 mg L^{-1} de BAP; afirma también que el número de brotes por explante se incrementa a partir del tercer subcultivo, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este proyecto. Bravo y Zúñiga (1992) informaron que la utilización de la citoquinina BAP (1 mg L^{-1}) permitió la obtención de brotes múltiples, pero fue necesario emplear luego un tratamiento con auxinas para la elongación de los brotes.

Elongación de los brotes

Los brotes de hortensia proliferados *in vitro* se sometieron a distintos períodos de oscuridad para estimular la elongación de los brotes y obtener así plantas competentes para la fase de enraizamiento. En la figura 4 se observa que los mejores resultados se obtuvieron cuando el

período de oscuridad fue de entre 3-4 semanas. Según Basuk y Maynard (1987), la etiolación aumenta considerablemente la sensibilidad del tallo a la auxina e induce cambios anatómicos en los tejidos del tallo que podrían incrementar la iniciación de primordios radicales, principalmente por las células parenquimáticas indiferenciadas y la falta de barreras mecánicas.

Según lo observado por Hansen (1987), la formación de raíces en estaquillas está influenciada por las condiciones de luz durante el crecimiento de las plantas. La exclusión de luz a la totalidad del brote, antes de la propagación, estimula la formación de raíces en algunas plantas leñosas. También lo demuestra el ensayo realizado por Karhu (1992), quien, al estudiar el efecto de la etiolación y el sombreado en el enraizamiento potencial de ornamentales leñosas, reportó que tanto el número como el porcentaje de raíces fueron mayores en las estaquillas etioladas.

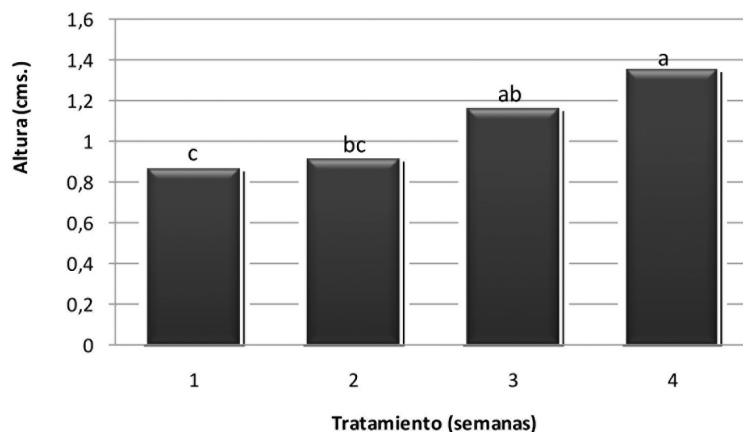


Figura 4. Efecto de diferentes tratamientos de oscuridad sobre la elongación de plántulas de hortensia (*Hydrangea macrophylla*). Los datos representan la media de 30 repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para $p < 0.05$ por el test de Duncan.

Enraizamiento de las plántulas

En la figura 5 se presentan los resultados relacionados con el porcentaje de enraizamiento, e indican que cuando se adicionó al medio de cultivo $0,825 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato de amonio sin Acido Indolbutírico se logró el mejor resultado, con un porcentaje de enraizamiento del 99%.

Todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Resultados obtenidos por Abaud Dahab (2007) registraron la mejor respuesta de enraizamiento de *Hydrangea* sp. con AIB (2 mg L^{-1}) y un medio con las sales MS diluidas a la mitad más carbón activado.

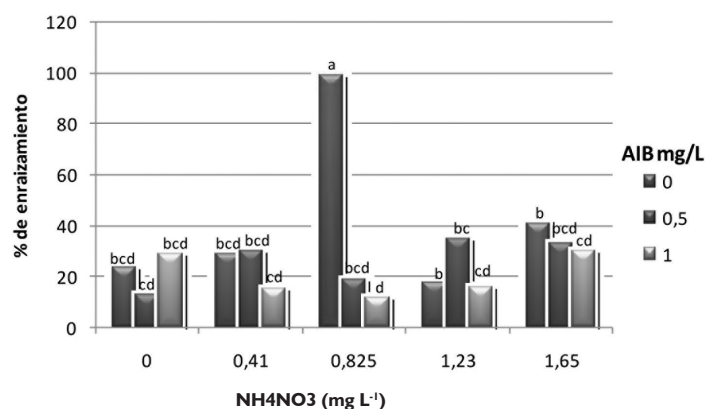


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de nitrato de amonio en combinación con AIB sobre el porcentaje de enraizamiento de plántulas de hortensia (*Hydrangea macrophylla*). Los datos representan la media de 30 repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para $p < 0.05$ por el test de Duncan.

Conclusiones

Se desarrolló un protocolo para el establecimiento y proliferación *in vitro* en la producción de plantas madre de hortensia *Hydrangea macrophylla* libres del virus TSWV, para la obtención de esquejes con características superiores.

En la fase de establecimiento los mejores resultados se dieron cuando los explantes se sometieron a una desinfección con hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos, con un porcentaje de 66% de prendimiento.

Los mejores coeficientes de proliferación se obtuvieron cuando se le adicionó al medio de cultivo 1 mg L⁻¹ de BAP, con una tasa de proliferación de 2 brotes/frasco.

Con relación a la elongación de los brotes, los mejores resultados se obtuvieron al someterlos a oscuridad durante tres y cuatro semanas.

Se obtuvo el 99% de enraizamiento al adicionar al medio de cultivo 0,825 mg L⁻¹ de nitrato de amonio sin AIB, lo que demuestra que la hortensia es una planta de fácil enraizamiento y propagación.

Referencias

Abou Dahab, A. M. (2007). In vitro propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb. *Arab J. Biotech.*, 10(1), 161-178. [Revista en línea] Disponible en: www.acgssr.org [Consulta: noviembre de 2009].

AGDIA (2008). Product catalog. Your partner in agricultural diagnostics.

Arango, M. M. (2003). *Hydrangea*. Bogotá: Ediciones Hortitecna Ltda.

Barbat, T. (2006). La multiplicación de las plantas. *Horticultura Internacional*, 1, 32-43. Revista

Extra [En línea]. Disponible en: www.dialnet.unirioja.es [Consultado: marzo de 2009].

Bravo, C. y Zúñiga, P. (1992). *In vitro* micro-propagation of *peppernigrum*. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Departamento de agronomía.

Cañal, M. J.; Rodríguez, R.; Fernández, B.; Sánchez, R. T. y Majada, J. P. (1999). Fisiología del cultivo in Vitro. En: *Libro de reportes cortos*. Quinto coloquio internacional de biotecnología vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, pp. 14-22.

Cassells, A. C. and Tahmatsidou, V. (1996). The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hydrangea* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47, 15-26.

López, P. D. y Carazo, G. N. (2005). La producción de esquejes. *Horticultura Internacional*, 1, 22-29. Revista Extra [En línea] Disponible en: www.horticom.com [Consultado: marzo de 2009].

Llorente, M. Á. (2007). La exportación de flores a Europa requiere nuevas rutas. Bogotá.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Planta.*, 15, 473-497.

Ossa, R., M. A. (2006). Director Asocolflores Antioquia. Conversación personal.

Sagasta M. L. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundiprensa.

Sebastian, T. K. and Heurser, C. W. (1987). *In vitro* propagation of *Hydrangea quercifolia*. *Bartr. Scientia Hort.*, 31, 303-309.