

INOCULACION BACTERIANA DE SUSTRATOS EN LA ACLIMATIZACION DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *SPATHIPHYLLUM*

S M CARLETTI, N M APOSTOLO, B E LLORENTE

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CULTEV), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján CC 221 (6700) Luján, Buenos Aires Argentina. Fax: 0323-25795. e. mail: carletti@mail.unlu.edu.ar

BACTERIAL INOCULATION OF SOIL MIXTURE FOR ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED *SPATHIPHYLLUM* PLANTS

Micropropagated plants need an acclimatization step before transplanting them to soil and different substrates can be used. A commercial substrate (Agroplus®) and a soil mixture (soil:sand:peat:perlite 5:1:1:1) were tested for acclimatization of *Spathiphyllum* plants. *Azotobacter chroococcum* inoculum was applied in order to observe the inoculation effect on plant growth-promotion. The survival of plants developed on Agroplus® was 100%. They showed significant increases ($P < 0.05$) on roots fresh weight (101%) and root surface area (97.5%) on inoculated treatments. When *A. chroococcum* inoculation and soil mixture were used for acclimatization of plants, a significant increase (123%) on root dry weight was detected. This treatment showed a behavior like control Agroplus® substrate. Our results could indicate the ability of *A. chroococcum* to stimulate the growth of *Spathiphyllum* micropropagated plants on acclimatization substrates.

Key words: Acclimatization - *Azotobacter chroococcum* - Micropropagation - Plant growth-promoting rhizobacteria - *Spathiphyllum*

INTRODUCCION

Las plantas micropropagadas son sometidas a situaciones de estrés cuando se transfieren de las condiciones de cultivo *in vitro* a ambientes de invernáculo o campo. Si no se tratan adecuadamente, estos ejemplares suelen presentar signos de marchitamiento, necrosis en bordes y ápices foliares y hasta la muerte de la planta entera (Preece, Sutter 1991). La aclimatación consiste en trasplantar las plantas micropropagadas a sustratos específicos reduciendo gradualmente la humedad (Díaz-Pérez *et al.* 1995), asegurando la supervivencia de las mismas. El medio de crecimiento y soporte de la nueva planta es importante para lograr una buena adaptación, se emplean sustratos uniformes con pH adecuado y elevado poder de retención hídrica (Dunstan 1981).

Las raíces formadas *in vitro* frecuentemente carecen de pelos radicales y pueden morir poco después del trasplante (Debergh, Maene 1981). Existen ciertas bacterias diazotróficas (fijadoras del nitrógeno atmosférico) que producen sustancias reguladoras del crecimiento como las fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas) (Tien *et al.* 1979, González-López *et al.* 1986) que inducirían cambios morfológicos en las raíces, como aumento de longitud y área de absorción, mayor número de pelos radicales, etc. (Abbass, Okon 1993, Carletti *et al.* 1994b). Estos microorganismos (*Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp, *Bacillus* sp, etc.)

estimulan el crecimiento de plantas tales como gramíneas y especies hortícolas entre otras, incrementando los rendimientos de los cultivos (Okon, Labandera-González 1994). Se ha comprobado que esas bacterias influirían también en el enraizamiento *in vitro* de plantas micropropagadas (Carletti *et al.* 1994a, 1995a).

Spathiphyllum wallisii Regel (Fam. Aráceas) espatifilo es una especie ornamental muy difundida en el país. Es acaule de hojas largamente pecioladas con sistema radical adventicio que crece en suelos fértiles, propagándose principalmente por matas (Parodi 1978). Algunos autores han reportado estudios fisiológicos en esta especie durante la etapa de aclimatación (van Huylbroeck *et al.* 1995). El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en los sustratos de aclimatación de plantas micropropagadas de *S. wallisii* Regel.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo *in vitro*

Las plantas de *S. wallisii* Regel fueron multiplicadas *in vitro* en medio de cultivo con sales MS (Murashige, Skoog 1962), vitaminas de Gamborg B₅ (Gamborg *et al.* 1968), sacarosa 30 g l⁻¹, mioinositol 100 mg l⁻¹ y agar (Sigma) 7 g l⁻¹, suplementado con bencilaminopurina (BAP) 1 mg l⁻¹ (esterilizado a 121°C durante 15 minutos). El material así cultivado permaneció cinco semanas a 24 ± 2°C y 16 h luz día⁻¹.

Cultivo bacteriano

Se ensayó la cepa 42 (aislamiento local) de *A. chroococcum* que creció en medio de cultivo líquido (Brown *et al.* 1962) incubado a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ en agitación mecánica (180 rpm con excentricidad de 2,5 cm) durante siete días. Se logró una concentración equivalente a 10^8 unidades formadoras de colonia (ufc ml^{-1}) determinada por recuento en placas.

Aclimatización

Las plantas fueron removidas de los frascos de cultivo y las raíces se enjuagaron con agua estéril para eliminar los restos de medio de cultivo adheridos a su superficie. Las mismas fueron transplantadas individualmente a envases con cubierta transparente para evitar la desecación, manteniendo las condiciones de asepsia. Se ensayaron dos sustratos: uno artificial comercial (Agroplus® cedido por Lage y Cia., Montevideo, Uruguay) con elevado tenor de materia orgánica; pH 4,78, porosidad calibrada para buena retención de humedad y sin sustancias tóxicas, y otro formado por una mezcla con volúmenes proporcionales de tierra fértil, arena, turba y perlita (5:1:1:1). Ambos sustratos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 2 h. Se cultivó una planta micropropagada por recipiente y se regó a saturación con agua destilada estéril. A los siete días del transplante a los diferentes sustratos, las plantas se inocularon en su base con 1 ml de la suspensión bacteriana y se regaron con agua estéril. Los testigos fueron tratados de la misma forma con el agregado de medio de cultivo estéril. Los recipientes de los cuatro tratamientos (Agroplus® testigo, Agroplus® inoculado, mezcla testigo y mezcla inoculado) se colocaron en cámara de cultivo a $24 \pm 2^\circ \text{C}$ y con fotoperíodo de 16 h día^{-1} bajo luz fluorescente ($90 - 110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante seis semanas. A partir de la segunda semana de iniciado el ensayo, se retiraron gradualmente las cubiertas de los recipientes, para asegurar la aclimatización de las plantas a las futuras condiciones de temperatura y humedad relativa de invernáculo.

Evaluación de parámetros y diseño estadístico

Las plantas micropropagadas tenían un sistema radical adventicio (raíz principal) en el momento del transplante a los sustratos. Durante la aclimatización se produjeron nuevas raíces adventicias a partir de los primeros nudos del corto tallo (raíces caulógenas), que penetraron en el sustrato. Se realizaron observaciones semanales durante las seis semanas de cultivo, estimando el crecimiento de las plantas a través del número de hojas y aparición de raíces caulógenas. A la sexta semana se evaluó el porcentaje de supervivencia y el número, peso fresco y seco a 105°C de raíces caulógenas por planta. También se estimó el área o superficie de absorción radical por el método descrito por Carley y Watson (1966) que consiste en hacer una determinación indirecta por medio de la diferencia de peso de una raíz que se sumerge en una solución saturada de nitrato de calcio, registrando la cantidad adsorbida por cada raíz en estudio. Asimismo, se determinó el peso fresco y seco a 105°C de la raíz principal y su área de absorción en el inicio y final del experimento, con el fin de estimar un índice de crecimiento para cada tratamiento. La experiencia se realizó con diez repeticiones por tratamiento siguiendo un diseño completamente aleatorizado y los resultados se evaluaron por el análisis de la varianza (ANOVA) comparando las medias según la prueba DSM ($P < 0,05$) (Little, Hills 1976).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las plantas crecidas en Agroplus® como sustrato para aclimatización tuvieron un 100% de superviven-

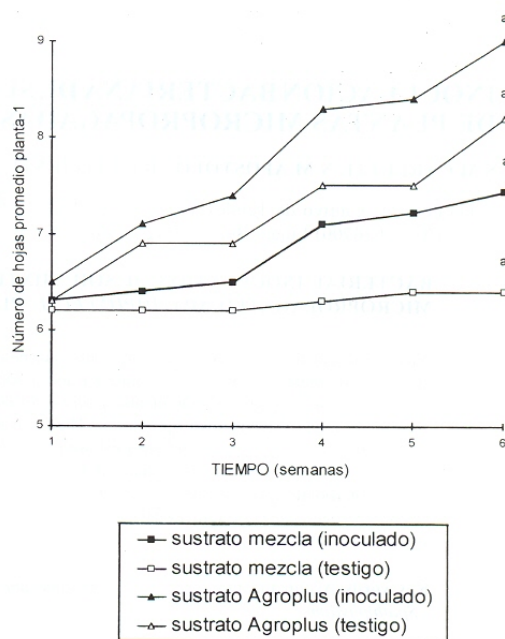


Figura 1. Efecto de la inoculación con *A. chroococcum* en la aclimatización de *S. wallasii* Regel: crecimiento del vástago.

cia. Cuando se empleó mezcla como sustrato se observó un 80% de supervivencia para el tratamiento testigo y un 90% en la mezcla inoculada con *A. chroococcum*. El crecimiento de la parte aérea (número de hojas promedio por planta) mostró una tendencia similar en los cuatro tratamientos. En los dos sustratos ensayados se observó un efecto positivo de la inoculación con *A. chroococcum* (Figura 1). Estos resultados concuerdan con los observados por Carletti *et al.* (1996) en plantas micropropagadas de portainjerto de cerezo aclimatizadas en sustratos similares e inoculadas con *Azospirillum brasilense* Cd. Las plantas crecidas en sustrato comercial comenzaron a desarrollar las raíces caulógenas en la cuarta semana de cultivo y en sustrato mezcla a la quinta semana. El peso fresco de las raíces principales y caulógenas de las plantas se incrementó en forma significativa con valores de 101 % y 23 % respectivamente con la aplicación de *A. chroococcum* en el sustrato Agroplus®. El área superficial de la raíz principal aumentó significativamente un 97,5% por la inoculación del sustrato Agroplus®, mientras que el incremento en sustrato mezcla no fue significativo (34 %) (Tabla 1). Estos resultados son similares a los encontrados por Carlettiet al. (1996) en plantas de cerezo inoculadas con *A. brasilense*. Con respecto al estímulo bacteriano sobre el peso seco de la raíz principal, los incrementos signi-

Tabla I. Peso, área de absorción y número de raíces del sistema radical principal y caulógeno de plantas aclimatizadas de *S. wallasi* Regel inoculadas con *A. chroococcum*, en dos tipos de sustratos (mezcla y Agroplus®).

Sustrato	Tratamiento	Peso (g)		Raíz principal ¹	Peso (g)		Raíces caulógenas ²	Área de absorción
		fresco	seco	Área de absorción (g (NO ₃) ₂ Ca raíz ⁻¹)	fresco	seco	Número de raíces	
Mezcla	testigo	2,82 a	3,54 a	5,33 a	0,92 a	0,17 a	8,6 a	0,26 a
	inoculado	5,17 ab	7,90 b	7,14 ab	0,91 a	0,19 a	9,3 ab	0,29 a
Agroplus®	testigo	4,89 a	8,44 b	5,28 a	1,36 b	0,26 ab	10,9 ab	0,49 ab
	inoculado	9,86 b	10,18 b	10,43 b	1,67 c	0,30 b	12,4 a	0,61 b

1. Los datos presentados en raíz principal son índices de crecimiento (valor final / valor inicial). 2. Los datos presentados en raíces caulógenas son valores finales (última semana del cultivo). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

ficativos fueron de 123 % cuando se usó sustrato mezcla, en cambio cuando se empleó Agroplus® los incrementos observados no fueron estadísticamente significativos. En relación a los otros parámetros evaluados pudo apreciarse el efecto estimulante de *A. chroococcum* en el desarrollo radicular de plantas de *S. wallasi* Regel micropropagadas y aclimatizadas en diferentes sustratos.

Algunos investigadores han utilizado distintas metodologías para asegurar la supervivencia de plantas micropropagadas en la etapa de aclimatización (Roberts, Smith 1990, Carletti *et al.* 1996). Varios autores han trabajado en la aclimatización de plantas micropropagadas de *Spathiphyllum* utilizando la técnica de enraizamiento *ex vitro*, iniciando la etapa de aclimatización con plántulas sin raíces (van Huylensbroeck *et al.* 1995), pero ninguno ha informado sobre el uso de bacterias como *Azotobacter* para mejorar la aclimatización de esta especie vegetal micropropagada.

Los resultados obtenidos en nuestras experiencias indicarían la conveniencia de la inoculación con una rizobacteria promotora del crecimiento en la etapa de aclimatización de esta especie ornamental. La aplicación de la bacteria ensayada en ambos sustratos aumentó el crecimiento del vástago de *S. wallasi* Regel con mayor producción de follaje. También mejoró el desarrollo de las raíces principales y caulógenas, con área de absorción significativamente mayor cuando se utilizó Agroplus® como sustrato de rusticación. La producción de mayor masa radical se manifestó en ambos sustratos y como respuesta al estímulo bacteriano en la promoción del crecimiento. Todos estos resultados podrían deberse a un efecto de tipo hormonal (como el de auxinas, citocininas y giberelinas) producido por la bacteria y

liberado al medio durante su cultivo. Las observaciones realizadas en esta experiencia son comparables a las mostradas por Abbass y Okon (1993) al inocular con *Azotobacter paspali* plántulas de trigo, canola, tomate y girasol.

REFERENCIAS

- Abbas Z, Okon Y. 1993. Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 25 : 1075-1083.
- Brown M E, Burlingham S K, Jackson R M. 1962. Studies on *Azotobacter* species in soil. II Population of *Azotobacter* in the rhizosphere and effects on artificial inoculation. *Plant Soil* 18: 320-332.
- Carletti S M, Llorente B E, Rodríguez Cáceres E A. 1994a. Influences of PGPR strains on Jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) micropropagated *in vitro*. En: Ryder M H, Stephens P M, Bowen G D (Eds.) *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. CSIRO, Australia. p. 36.
- Carletti S M, Rodríguez Cáceres E A, Llorente B E. 1994b. Growth promotion by PGPR on different plant species growing in hydroponic conditions. En: Ryder M H, Stephens P M, Bowen G D (Eds.) *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. CSIRO, Australia. p. 40-42.
- Carletti S M, Arjona C, Rodríguez Cáceres E A, Llorente B E. 1995a. Use of *Azospirillum brasilense* as root growth promoter on *in vitro* cultured MM 111 apple (*Malus domestica* Borkh). En: 2do. Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO'95: A - 25.
- Carletti S M, Rodríguez Cáceres E A, Arjona C, Llorente B E. 1996. Aplicación de *Azospirillum brasilense* a plantas micropropagadas de portainjerto de cerezo en la etapa de aclimatización. XIX Congreso Argentino de Horticultura: 194.
- Carley H E, Watson R D. 1966. A new gravimetric method for estimating root-surface areas. *Soil Science* 102: 289-291.
- Debergh P C, Maene L J. 1981. A scheme for commercial

- propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.* 14: 335-345.
- Díaz-Pérez J C, Sutter E G, Shackel K A. 1995. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiol. Plant.* 95: 225-232.
- Dunstan D I. 1981. Transplantation and post-transplantation of micropropagated tree-fruit rootstocks. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 31: 39-45.
- Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- González-López J, Salmeron V, Martínez-Toledo M V, Ballesteros F, Ramos-Cormenzana A. 1986. Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. *Soil Biol. Biochem.* 18: 119-120.
- Little T M, Hills F J. 1976. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Ed. Trillas, México, 53-77.
- Okon Y, Labandera-González C A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation studies. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- Parodi L. 1978. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo 1 y 2. 3ª edición. Editorial ACME S.A.C.I. Buenos Aires. Argentina. pp: 195
- Preece J E, Sutter E G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh P C, Zimmerman R H (Eds) *Micropropagation Technology and Application* Kluwer Academic Publishers, pp. 71-93.
- Roberts A V, Smith E F. 1990. The preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplantation to soil: I. Protection of roots by cellulose plugs. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 21: 129-132
- Tien T M, Gaskins M H, Hubbel D H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- van Huylenbroeck J M, Huygens H, Debergh P C. 1995. Photoinhibition during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite" plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 31: 160-164.