

## Micropropagación de Alcachofas: Técnica Eficiente para una Multiplicación con Calidad Productiva y Sanitaria

*Si bien una planta de alcachofa proveniente de un proceso in vitro, tiene un costo mucho más elevado que una planta proveniente de tallo o rizoma, el contar con un material libre de la mayoría de las enfermedades vasculares que atacan al cultivo, que no requiere replante y que ojalá, mantenga su potencial productivo, puede ser el cambio que la alcachofa está necesitando, para seguir siendo una de las principales hortalizas producidas en el país.*

- ▶ **Constanza Jana A.**  
Investigadora  
INIA - Intihuasi  
cjana@inia.cl
- ▶ **Roxana Gutiérrez L.**  
Investigadora  
INIA - Intihuasi  
rgutierrez@inia.cl
- ▶ **Cornelio Contreras S.**  
Investigador  
INIA - Intihuasi  
Cornelio.contreras.seguel@gmail.com
- ▶ **Víctor Alfaro E.**  
Investigador  
INIA - Intihuasi  
valfaro@inia.cl

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se basa en el principio de la totipotencialidad celular, que corresponde a la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones químicas y físicas, a partir de un trozo de tejido de la planta. Cuando un tejido vegetal con potencialidad de diferenciación se incuba en condiciones favorables, genera un nuevo individuo.

La técnica de micropropagación se refiere a la multiplicación de un tejido vegetal en condiciones asépticas de laboratorio y utilizando medios de cultivo adecuados. Esta práctica permite aumentar aceleradamente el número de plantas derivadas de un genotipo, reducir el tiempo de multiplicación, multiplicar un gran número de plantas en un espacio reducido, controlar el estado sanitario del material vegetal y facilitar el transporte del material propagado *in vitro*.

Los pasos fundamentales para la micropropagación eficiente de una especie son: a) establecimiento aséptico del cultivo; b) multiplicación, y c) el enraizamiento y preparación para su trasplante al suelo.

Para su mejor comprensión, el presente artículo cuenta con un glosario de términos y siglas (palabras en negrita).

### Propagación en alcachofa ◀

En la mayoría de los países donde se cultiva, la alcachofa se propaga casi exclusivamente en forma vegetativa. El material de propagación (propágulo) se obtiene directamente de plantas adultas en el mismo campo, con un mínimo proceso de selección. Esto genera dos grandes problemas que han mermado los rendimientos del cultivo; por una parte se utilizan propágulos de plantas que han sido malas productoras y por otra se transmiten enfermedades a las nuevas plantaciones.

Para solucionar el primer problema, una alternativa es la selección clonal, que como su nombre lo indica, consiste en la selección y propagación de los mejores materiales o clones y usar solo esos materiales para la propagación del siguiente cultivo. Esto se utiliza con éxito en países donde este cultivo es muy importante como España o Italia, donde ya se han logrado obtener nuevas variedades a partir de la selección clonal sobre el cultivo. Si estos nuevos materiales se encuentran en bajo número como para establecer una nueva plantación comercial a partir de ellos, la alternativa es la multiplicación *in vitro*, que permite masificar en número un material que se encuentra en baja cantidad, rápidamente.

El segundo problema de transmisión de enfermedades ha generado la presencia tanto en el material vegetal como en los suelos de las zonas productoras de alcachofa, una serie de enfermedades vasculares de difícil o nulo control, además de propagar virus desde materiales enfermos a las nuevas plantaciones. Un estudio realizado por INIA Intihuasi con los dos materiales de propagación vegetativa más utilizados en alcachofa: **tallos** y **rizomas**, muestra el bajo porcentaje de prendimiento de estos materiales (Figura 1) que a las seis semanas después de plantación logró sólo el 50% de prendimiento. En este

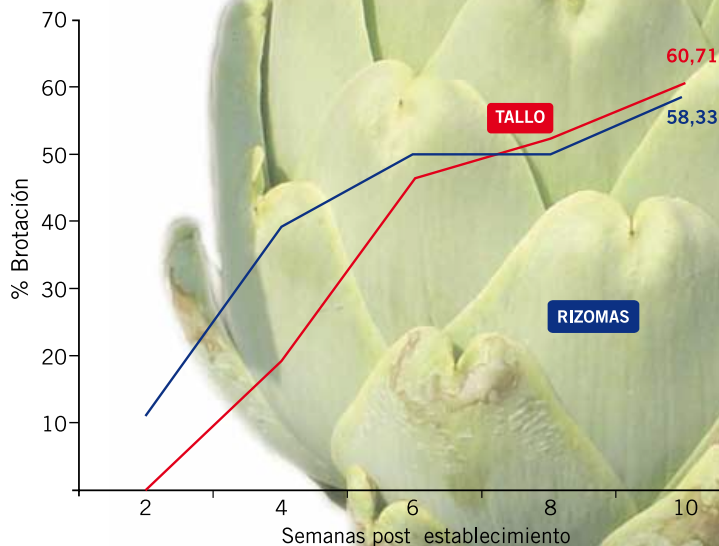
caso específico, ello se debió a la presencia de *Fusarium oxysporum* en rizomas y tallos de una plantación comercial de la región de Coquimbo, enfermedad vascular que junto a *Verticillium* son las principales enfermedades para esta especie.

La alcachofa se considera una planta rústica que es capaz de producir con la presencia de estas enfermedades, pero su potencial de rendimiento baja mucho. Para solucionar este problema la propagación *in vitro* también es una alternativa viable ya que antes de la micropropagación, el material que va a ser usado se somete a exhaustivas prácticas de desinfección y esterilización.

Lo anterior ha despertado el interés de los investigadores a nivel mundial, por desarrollar técnicas de propagación *in vitro* para esta especie. Es así como en Italia, esta técnica está ampliamente difundida y ya se comercializan plantas *in vitro* de alto nivel sanitario y productivo. Sin embargo, para el caso de alcachofas precoces en entrar en producción, como es el caso de Blanca de Tudela de España, la micropropagación no se ha desarrollado como herramienta, debido a que se ha observado una pérdida de precocidad de los materiales propagados y una tasa muy baja de multiplicación. Dado que la variedad Argentina en Chile también es precoz, se espera que sufra la misma pérdida, pero no existe información al respecto.

Con el objeto de adecuar un protocolo para la multiplicación *in vitro* de alcachofa argentina y evaluar la entrada en producción de las microplantas, INIA Intihuasi con financiamiento aportado por Innova CORFO, adaptó un protocolo de propagación de alcachofa Green globe (argentina), utilizando **tejido meristemático** como **explante** y evaluó la entrada en producción con y sin ácido giberélico para favorecer la inducción floral, cuyos principales resultados se presentan a continuación.

► **Figura 1.** Porcentaje (%) de prendimiento de propágulos vegetativos utilizados comúnmente en alcachofa.





## Etapas en la propagación in vitro de plantas de alcachofa ◀



Recolección de hijuelos.

1



Lavado bajo agua corriente y eliminación de hoja

2



Deshoje de hojas externas del hijuelo

3



Tamaño de hijuelo final previo a desinfección

4

### Etapa 1. ◀

Selección y acondicionamiento de explantes. El material vegetal a utilizar debe provenir de hijuelos idealmente juveniles (no más de 4 semanas). Debe ser recolectado el mismo día en que se va a sembrar, ya que se ha visto disminución en el porcentaje de prendimiento cuando se recoge el día anterior a la siembra. A los hijuelos se les eliminan las hojas viejas, las raíces y el suelo adherido; se les corta el follaje, dejándolos de aproximadamente 30 cm. Una vez en el laboratorio, se eliminan las hojas externas y se lavan bajo agua corriente, dejándolos de aproximadamente 3 a 5 cm de largo (Fotos 1 a 4).







## Etapa 2.

Desinfección de explantes. Para facilitar la manipulación, se corta la base de la yema con **primordios foliares** en forma rectangular. Luego se lava tres veces con agua destilada y se lleva a la cámara de flujo laminar donde se sumerge por un minuto con alcohol al 70%, para facilitar la penetración del desinfectante, ya que elimina las burbujas de aire. La desinfección se realiza con hipoclorito de sodio al 2% por 12 minutos. Se enjuaga tres veces con agua destilada y se sumerge en una solución antioxidante de ácido ascórbico (100 mg en 200 ml de agua destilada), que evita la **fenolización** de los tejidos (Foto 5).

Desinfección de explantes

5



## Etapa 3.

Preparación de medio de cultivo y esterilización. Como medio de cultivo se utiliza un medio Murashige y Skoog (Medio MS), que contiene macro y micronutrientes, sales y vitaminas, y que se ajusta a pH 5,7. A este medio se le adicionan diferentes reguladores de crecimiento, de acuerdo con cada fase de desarrollo: iniciación, multiplicación, enraizamiento. Todos los materiales que ingresan a la sala de siembra, incluido el medio, deben ser esterilizados en autoclave a 121°C y 1,2 k/cm<sup>2</sup> de presión por 20 minutos (Foto 6).

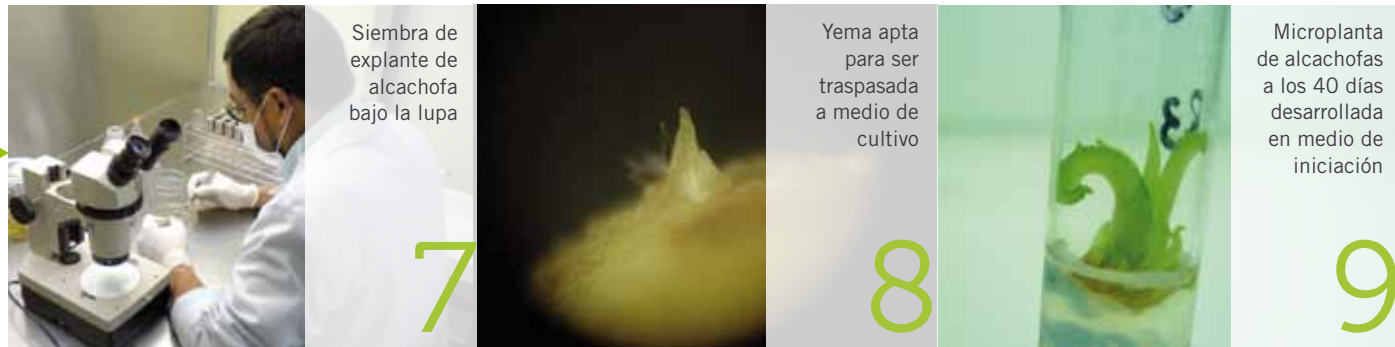
Autoclave para esterilización de medios de cultivo y de todos los materiales utilizados para la siembra de explantes

6



## Etapa 4. Micropropagación

Consta de 4 fases:



Siembra de explante de alcachofa bajo la lupa

7

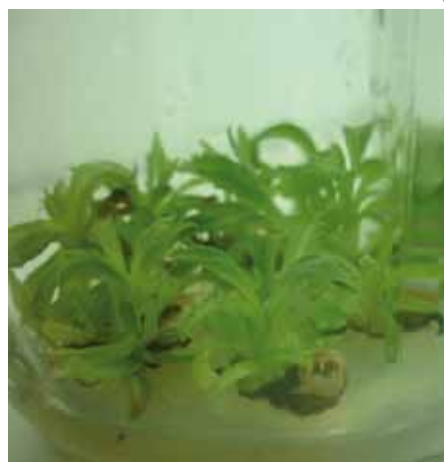
Yema apta para ser traspasada a medio de cultivo

8

Microplanta de alcachofas a los 40 días desarrollada en medio de iniciación

9

**Fase de iniciación.** Esta fase se realiza con ayuda de una lupa estereoscópica en la **cámara de flujo laminar**, extrayendo la yema de crecimiento con 3 ó 4 primordios foliares (Fotos 7 y 8) constituyendo los explantes, que son sembrados en medio MS de iniciación con ANA (0,5 ppm) y BAP (0,2 ppm), sacarosa a pH 5,7 y agar como gelificante (convierte al medio líquido en sólido). Las condiciones de cultivo durante los primeros días son de oscuridad para pasar paulatinamente a 3.000 lux con temperatura de 24°C, fotoperiodo de 16 horas por un período de 40 días. Durante este tiempo la yema crece hasta alcanzar un tamaño aproximado de 2 cm (Foto 9) de longitud. Cada 7 a 10 días se debe ir subcultivando con el mismo medio de cultivo, para evitar la oxidación.



Microplantas de alcachofas después de 6 semanas en medio de multiplicación

10



Nuevas microplantas que generarán exponencialmente nuevas plantas en medio de multiplicación

11

**Fase de multiplicación.** La etapa de multiplicación consiste en aumentar exponencialmente el número de plantas a partir de la planta generada de la yema original en la fase de iniciación. En el caso de las alcachofas, es posible obtener 5 a 8 nuevas plantas a partir de la primera yema y esto es posible de repetir por 5 veces sin que haya mutaciones causadas por el proceso o pérdida de vigor de plantas; de esta manera, potencialmente de 1 yema es posible generar 3.125 plantas. El medio de multiplicación es MS manteniendo concentraciones de sacarosa y pH inicial y suplementado con una mayor concentración de BAP en iguales condiciones de cultivo. Luego de 6 semanas es posible obtener los nuevos 5 a 8 brotes por planta (Foto 10), éstos se retiran (Foto 11) y cada uno de ellos generará nuevas plantas comenzando el ciclo nuevamente.



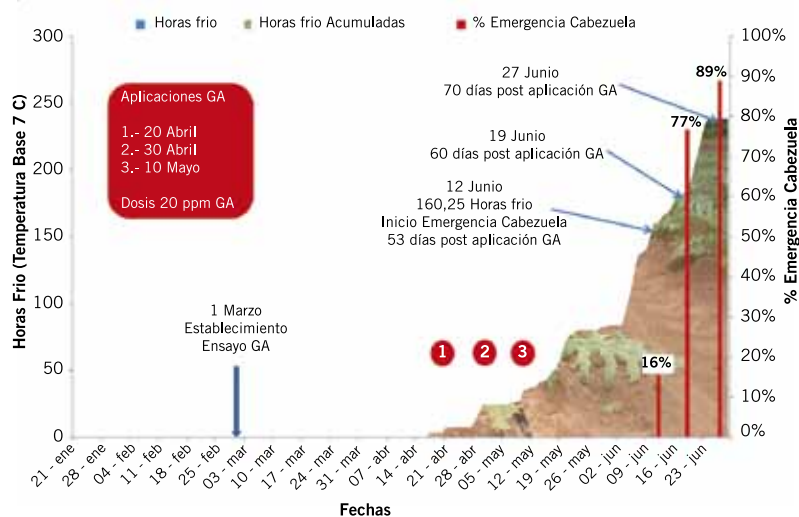


**Fase de enraizamiento.** La alcachofa presenta dificultad para el enraizamiento *in vitro*, por lo que se debe promover la diferenciación de tejidos para inducir la formación de raíces a través de reguladores de crecimiento. Para esto se trabaja en dos etapas. La primera, en donde los brotes de un tamaño superior a 2,5 cm son traspasados a medio MS suplementados con ANA por un período de 4 semanas (diferenciación- Foto 12) y una segunda etapa en medio MS suplementado con AIB, para estimular la proliferación de estas raíces en un periodo similar al anterior (Foto 13).



**Fase de aclimatación.** Cuando las raíces alcanzan longitudes mayores a 2 cm, se retiran del medio de cultivo y se lavan retirando todo el agar (Foto 14). Luego, se trasplantan en sustrato consistente en turba esterilizada y fertilizada en *speedling*. Para que el cambio no resulte tan severo, las primeras semanas se mantienen las condiciones de temperatura, humedad y luminosidad (Foto 15). El periodo de aclimatación dura entre 5 a 7 semanas para la obtención de una planta terminada. En total, el proceso de producción a partir de una yema para la obtención de más de 3.000 plantas listas para el trasplante, toma aproximadamente 10 meses. Esto significa que si queremos considerar oportunidad de plantación en enero, la siembra de las yemas para generar plantas *in vitro*, debiera ser hasta el mes de febrero del año anterior.





► **Figura 2.** Efecto de aplicación de GA en la floración de plantas de alcachofa argentina provenientes del proceso *in vitro*.

## Trasplante de microplantas de alcachofa a terreno definitivo ◀

El trasplante a campo se realiza con plantas desde 4 hojas verdaderas y su prendimiento es de un 95% a 100%. La alcachofa tipo argentina es considerada una variedad precoz, ya que entra rápidamente en producción en zonas de bajo frío como La Serena; es así que con plantaciones de enero-febrero, las primeras producciones se obtienen en mayo con cero horas bajo 7°C. Sin embargo, la literatura indica que al pasar por el proceso *in vitro*, las nuevas plantas adquieren juvenilidad y son lentas en entrar en producción. Para evaluar si esto ocurriría o no en la variedad argentinas obtenidas *in vitro*, se trasplantaron plantas *in vitro* de alcachofa el 1 de marzo de 2012 en dos tratamientos, con y sin **ácido giberélico (GA)**. La dosis de GA aplicada fue de 60 ppm en 3 aplicaciones de 20 ppm. Esta dosis es la mínima recomendada por el fabricante para las variedades precoces. Fue aplicado a partir de las 10 hojas verdaderas, que es el momento de la inducción floral en esta especie, lo que correspondió al 20 de abril de 2012, 30 de abril de 2012 y 10 de mayo de 2012. La aparición de la cabezuela, sólo en las plantas tratadas, ocurrió cuando la acumulación de horas frío (temperatura base de 7° C) fue de 160,25.

Al 27 de junio de 2012 con 238,25 horas bajo 7°C, las plantas de la variedad argentina sin GA aún no florecen (Figura 2). En este estudio se evaluará el rendimiento final de las plantas tratadas y sin tratar, para poder dar una recomendación de uso de ácido giberélico en plantas de alcachofa *in vitro*. Pero estos resultados permiten predecir que la pérdida de la juvenilidad en plantas de alcachofa argentina obtenida *in vitro* puede ser solucionada a través del uso de ácido giberélico como inductor floral.

Si bien una planta de alcachofa proveniente de un proceso *in vitro*, tiene un costo mucho más elevado que una planta proveniente de tallo o rizoma, el hecho de contar con un material que está libre de la mayoría de las enfermedades vasculares que atacan al cultivo, que no requiere replante y ojalá, que mantenga su potencial productivo de manera que se paguen los costos invertidos en la planta inicial, puede ser el cambio que este cultivo está necesitando, para seguir siendo una de las principales hortalizas producidas en el país.

## Glosario

- **Tallo:** conocido en Chile como “palo”, corresponde a la porción basal de aproximadamente 20 cm de un tallo productivo de la temporada anterior, que ha entrado en receso y tiene yemas en su base. Para su extracción no es necesaria la destrucción de la planta madre.
- **Rizoma:** conocido en Chile como “tronco”, corresponde a trozos del rizoma con algunas yemas, para lo cual se extrae el órgano completo destruyendo a la planta madre y, posteriormente, se divide en trozos. Es un nombre erróneo ya que en realidad es un tallo engrosado y subterráneo con una serie de yemas latentes.
- **Tejido meristemático:** tejidos responsables del crecimiento vegetal. Se caracterizan por mantenerse siempre jóvenes y poco diferenciados. Tienen capacidad de división y de estas células aparecen los demás tejidos.
- **Explante:** tejido removido de un organismo que es sembrado en medio artificial con nutrientes para la generación de un nuevo individuo.
- **Primordio foliar:** prominencia del ápice que dará lugar a una hoja.
- **Fenolización:** pardeamiento u oscurecimiento que se produce en los explantes, causada por la secreción de sustancias conocidas como fenoles, como respuesta al daño por parte de la planta al ser cortada.
- **Cámara de flujo laminar (CFL):** es un receptáculo con una sola cara libre, que permite trabajar en condiciones de esterilidad, porque circula aire filtrado de toda partícula extraña al interior de la cámara.
- **ANA:** Ácido Naftalenacético. Fitohormona del tipo auxina que actúa sobre la elongación celular.
- **BAP:** Bencilaminopurina. Fitohormona del tipo citocinina que promueve la división celular.
- **IBA:** Ácido Indolbutírico. Fitohormona del tipo auxina que al igual que ANA, actúa sobre la elongación celular.
- **Ácido Giberélico (GA):** Es una giberelina que promueve crecimiento y elongación celular. Es muy utilizado para acelerar la germinación de semillas que de otro modo permanecerían en receso.