

CONTROL DE LA VITRIFICACION EN LA MICROPROPAGACION DE ESTATICE (*Limonium sinuatum* Mill.) cv. MIDNIGHT BLUE.*

Vitrification control during the micropropagation procedures of *Limonium sinuatum* Mill cv. Midnight blue

Jaime Pedroza¹, Antonio Angarita² y Germán Corchuelo²

RESUMEN

Yemas axilares de una planta de estática (*Limonium sinuatum* Mill.) cv. Midnight Blue fueron adaptadas en cultivo aséptico y micropropagadas, inicialmente, según la técnica de Ruiz (1990). Con el objeto de evaluar algunos factores que influyen en la vitrificación de esta especie se estableció, mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial, un experimento utilizando diferentes concentraciones de BAP (0,5 y 1,0 mg.l⁻¹), Pantotenato de Calcio (1 y 2 mg.l⁻¹), Sacarosa (3 ; 4 y 5%) y Agar (0,6 ; 0,7 y 0,8 %), evaluándose simultáneamente la proliferación de yemas axilares. Se encontró que, particularmente, la sacarosa y el pantotenato de calcio controlan eficientemente este desorden fisiológico en concentraciones de 4% y 2 mg.l⁻¹, respectivamente, con una alta tasa de multiplicación utilizando 0,5 mg.l⁻¹ y 0,7% de agar.

Palabras claves: BAP, pantotenato de calcio, sacarosa, micropropagación.

SUMMARY :

Axilar buds of statice plants (*Limonium sinuatum* Mill. cv. Midnight Blue) were adapted in aseptic conditions and then micro-

propagated initially according to the technique of Ruiz (1990) to evaluate some factors that influence the vitrification of this species. A completely randomized design with a factorial treatment arrangement was used. Different concentrations of BAP (0.5 and 1.0 mg.l⁻¹), calcium pantotenate (1 and 2 mg.l⁻¹), sucrose (3, 4 and 5%) and agar (0.6, 0.7 and 0.8 %) were evaluated. It was found that particularly the sucrose and the calcium pantotenate controlled efficiently this physiological disorder in concentrations of 4% and 2 mg.l⁻¹ respectively, with a high multiplication rate using 0.5 mg.l⁻¹ of BAP and 0.7% of agar.

Key words: BAP, calcium pantotenate, sucrose, micropropagation.

INTRODUCCION

El estática (*Limonium sinuatum*) es una importante flor de corte empleada en arreglos secos y frescos (Wilfret, *et al.*, 1975), por su atractivo cáliz de larga duración y diversidad en coloración (Salinger, 1991). Las metodologías *in vitro* se han convertido en una alternativa para la introducción de nuevo material vegetal y nuevas variedades de esta especie en el mercado, durante corto tiempo y fenotípicamente homogéneas, teniendo en cuenta que la propagación por semilla no permite obtener plantas genéticamente iguales (Bienkowska *et al.*, 1994; Wicki, 1992). Aunque diversas metodologías se han utilizado en la propagación de varias especies del género *Limonium* (Butcher, *et al.* 1986; Harazy, 1985; Kunitake y Mill, 1990; Lledo *et al.*, 1994; Ovideo, *et al.*, 1988; Martin y Pérez, 1992;

* Recibido: Enero de 1997

1. Biólogo M. S. Apartado Aéreo 43079, Santafé de Bogotá. D. C.

2. Profesor Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 14496. Santafé de Bogotá, D. C.

Morgan et al., 1994 & Ruiz, 1990), ocurre la aparición de síntomas anormales como oxidación y vitrificación, que han sido controlados, parcialmente, al subcultivar los explantes a un medio básico según la formulación Murashige y Skoog (1962), suplementada con 0,6 - 1,2 mg.l⁻¹ de Bencil amino purina (BAP) (Harazy et al., 1985) y regulando el tipo y concentración del agente gelificador (Wetzstein et al., 1994). Sin embargo, al aplicar estas metodologías, el porcentaje de vitrificación es alto, situación que conlleva a una disminución en la cantidad de material micropropagado, como consecuencia de la deficiente diferenciación celular que acompaña a la vitrificación (Gaspar, 1995). Por esta razón, en este trabajo, se presenta una alternativa en el control de este desorden fisiológico con el fin de contribuir con los programas de propagación masiva de esta especie.

MATERIALES Y METODOS:

Se utilizaron yemas axilares de coronas vegetativas de una planta de estática (*Limonium sinuatum* Mill. cv. Midnight Blue) en segundo ciclo productivo, que, una vez seleccionadas de acuerdo con el vigor y estado de desarrollo, se desinfectaron en dos pasos.

- Enjuague con solución jabonosa.
- Tratamiento con etanol al 70% por 30 segundos, seguida de hipoclorito de sodio al 1% por diez minutos. A continuación, se enjuagaron cuatro veces en agua destilada estéril, durante cinco minutos cada una.

Una vez realizada la desinfección y bajo estereomicroscopio, se aislaron las yemas acompañadas de cuatro a seis primordios foliares para ser cultivadas asépticamente según las metodologías de Ovideo y Guevara. (1988), Ruiz. (1990) y Bienkowska et al.(1994). El material vegetal fue incubado en un cuarto de crecimiento a 22-25 ± 2°C con un fotoperiodo de 16 horas luz. Después de confirmarse la suficiente cantidad de material aséptico, se desarrolló, mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial, el experimento que se muestra en el cuadro 1, empleando el medio básico

formulado por Murashige y Skoog (1962), enriquecido con la citoquinina Bencil Amino Purina (BAP), Pantotenato de Calcio (PCA), Sacarosa y Agar - Oxoid, con diez repeticiones por tratamiento, con el fin de evaluar el porcentaje de vitrificación y, simultáneamente, la proliferación de brotes axilares. La prueba de comparación entre los tratamientos utilizada fue la de Polinomios Ortogonales (Steel y Torrie, 1985).

RESULTADOS

Se encontraron diferencias que estadísticamente son altamente significativas ($P < 0,01$) entre los 36 tratamientos evaluados para corregir la vitrificación, donde, de forma particular, el Pantotenato de Calcio y la Sacarosa disminuyen este desorden fisiológico (Figura 1).

Un incremento en la concentración de pantotenato de calcio de 1 a 2 mg.l⁻¹ disminuye el número promedio de brotes vitrificados de ocho (en 1 mg.l⁻¹) a dos (en 2 mg.l⁻¹) (Figura 1a). Simultáneamente, un aumento en la sacarosa de 3 a 5 % disminuye el número promedio de brotes vitrificados de 4,5 (en 3%) a 2,5 (en 5%) (Figura 1b). La vitrificación se eliminó completamente en los tratamientos que contenían las concentraciones más altas de pantotenato de calcio (2mg.l⁻¹), sacarosa (4 y 5 %) y agar (0,7 y 0,8%). Sin embargo, la interacción entre sacarosa y BAP muestra un comportamiento similar al observado con el pantotenato de calcio en cuanto a la disminución en el número de brotes proliferados a medida que aumenta la concentración de la citoquinina. Este hecho sugiere que la sacarosa podría presentar un efecto antagónico con el BAP y el pantotenato de calcio, en la proliferación de brotes (Figura 1 y 2).

De forma similar, el BAP y el Agar no afectaron las variables de respuesta evaluadas y no mostraron interrelaciones, a excepción del BAP con el Pantotenato de Calcio, donde ocurre una ligera disminución en el número de brotes vitrificados, presumiblemente ocasionada más por la vitamina que por la citoquinina, así, en términos generales, el aumento en alguno de los factores disminuye de

forma lineal o cuadrática el número de brotes, cuando permanecen constante los demás (Figura 1 y 2).

Teniendo en cuenta que la vitrificación, reportada por varios autores como una anomalía fisiológica en procesos de cultivo de

tejidos y, caracterizada por una apariencia vidriosa en brotes hiperhidratados con hojas translúcidas que muestran una reducción en las tasas de multiplicación y eventualmente pueden morir (Bhojwani y Razdan, 1983; Zimmerman, 1984), es ocasionada por los bajos niveles de cera depositada en la cutícu-

Cuadro 1. Diseño Experimental para evaluar la Proliferación de Brotes Axilares y el Control Osmótico en la Micropropagación de Estátice.

BAP (mg.L ⁻¹)	P. de CALCIO (mg.L ⁻¹)	SACAROSA (%)	AGAR (%)	TRATAMIENTO
0,5	1	3	0,6	1
			0,7	2
			0,8	3
		4	0,6	4
			0,7	5
			0,8	6
		5	0,6	7
			0,7	8
			0,8	9
	2	3	0,6	10
			0,7	11
			0,8	12
		4	0,6	13
			0,7	14
			0,8	15
		5	0,6	16
			0,7	17
			0,8	18
1	1	3	0,6	19
			0,7	20
			0,8	21
		4	0,6	22
			0,7	23
			0,8	24
		5	0,6	25
			0,7	26
			0,8	27
	2	3	0,6	28
			0,7	29
			0,8	30
		4	0,6	31
			0,7	32
			0,8	33
		5	0,6	34
			0,7	35
			0,8	36

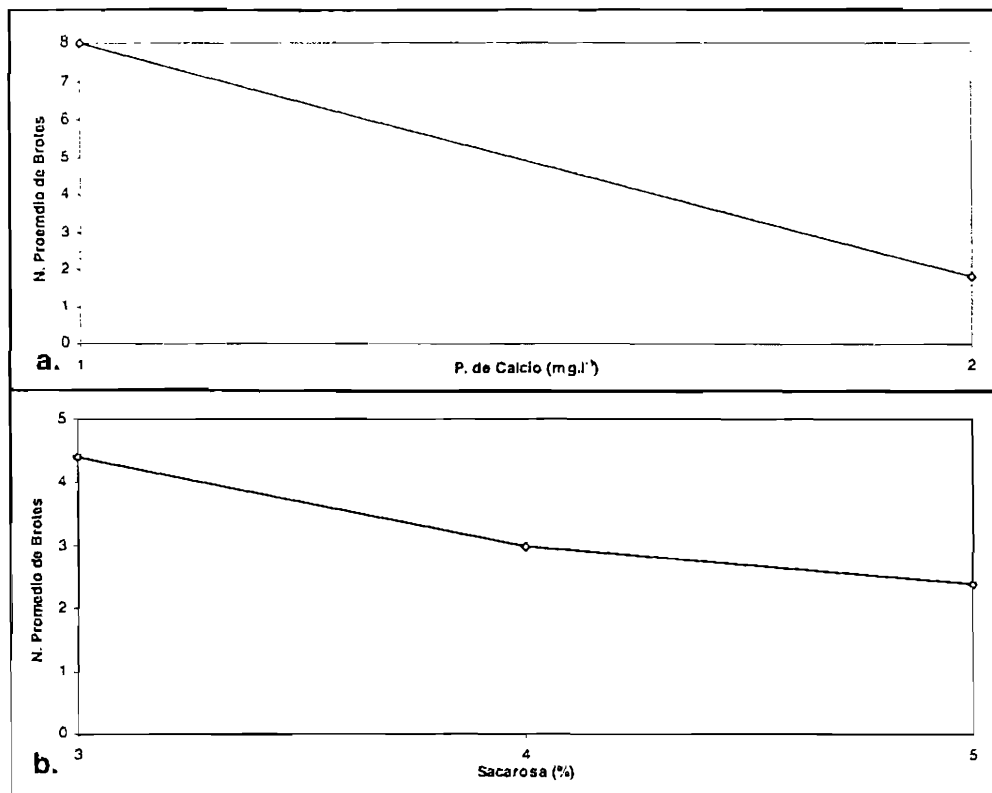


Figura 1. Efecto del pantotenato de calcio y la sacarosa en el número de brotes vitrificados. a. Pantotenato de calcio, b. Sacarosa.

la como consecuencia, bien sea de una alta humedad en el ambiente del explante o por la inhibición de su biosíntesis, inducida por los regímenes de reguladores de crecimiento (especialmente, elevadas concentraciones de citoquininas) y bajas concentraciones del agente gelificador o fuente carbonada, como la sacarosa, entre otros, que son necesarios en la regeneración vegetal (Stafford y Warren, 1991; Wetzstein *et al.*, 1994), se puede sugerir que la vitamina Pantotenato de Calcio podría estar involucrada, tanto en la biosíntesis de cera como en el suministro del ion calcio, para contribuir con la estructuración de las paredes celulares y así aumentar el control del balance hídrico a nivel tisular, mientras que la Sacarosa la reduce, probablemente por un proceso netamente físico, al incrementar el potencial osmótico en el medio de cultivo que trae como consecuencia una disminu-

nación en el potencial hídrico y, por consiguiente, menor disponibilidad de agua al tejido vegetal o por promover un anormal metabolismo de azúcares (Gaspar, 1995).

CONCLUSIONES

□ El pantotenato de calcio y la sacarosa controlan la vitrificación en concentraciones de 2 mg.l⁻¹ y 4 %, respectivamente.

□ El mayor número de brotes regenerados carentes de vitrificación se logró en el medio de cultivo caracterizado por la siguiente formulación:

- Sales Murashige and Skoog (1962)
- Bencil aminopurina (BAP) : 0,5 mg.l⁻¹
- Pantotenato de calcio : 2,0 mg.l⁻¹
- Sacarosa : 4,0 %
- Agar - Oxoid : 0,7 %

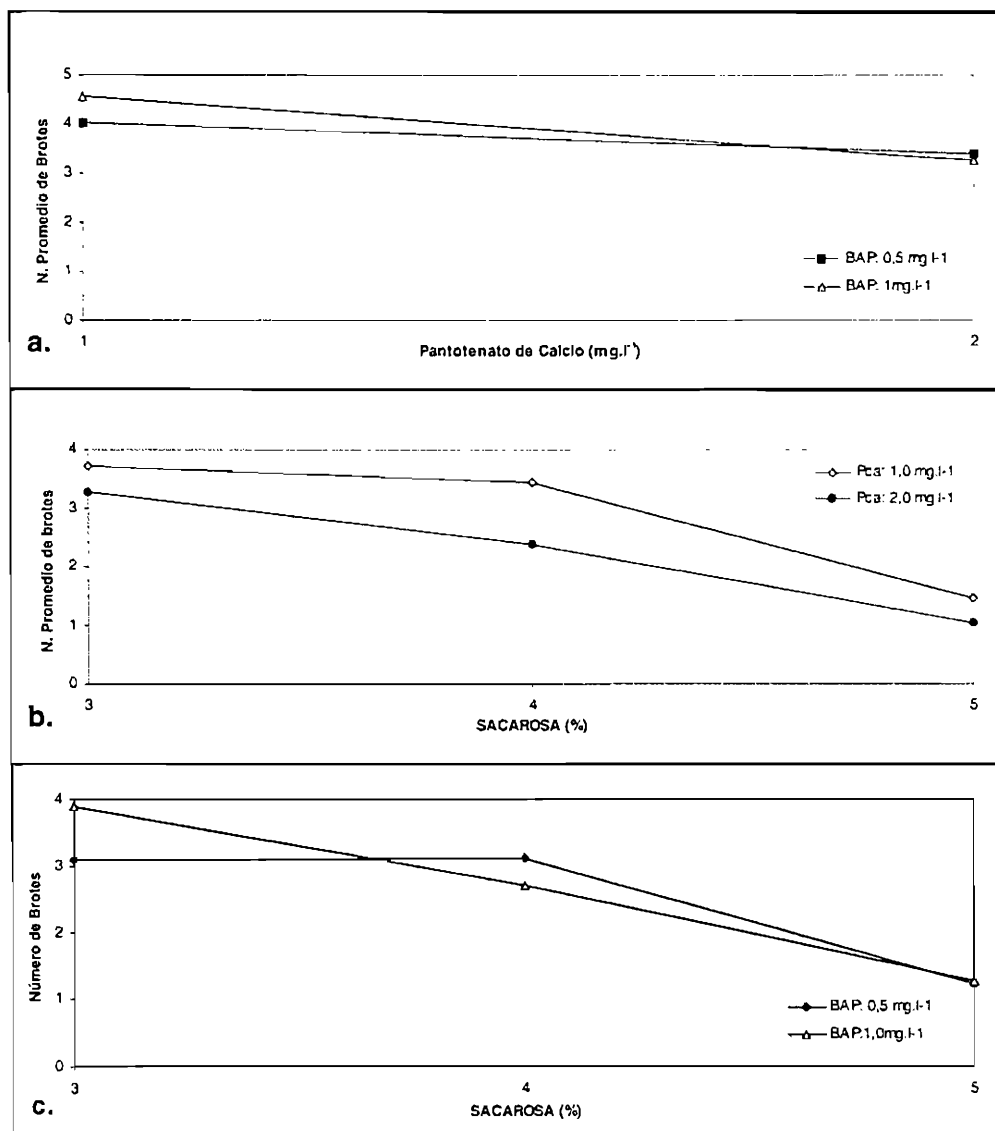


Figura 2. Efecto de las interacciones entre BAP, sacarosa y pantotenato de calcio en la proliferación de brotes a. P. de calcio vs. BAP; b. Sacarosa vs. P. de calcio; c. Sacarosa vs. BAP.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a la empresa Agrícola La Fontana, del grupo Farm Fresh Flowers y al doctor Juan Manuel Herrera, por el apoyo técnico y logístico.

BIBLIOGRAFIA

BIENKOWSKA, E. y NORWA, M. 1994. The environmental factors affecting growth and development of *Limonium sinuatum* in mother stock and *in vitro* culture. Abstracts VIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, Italy.

- BHOJWANI, S. y RAZDAN, M. K.** 1983. Plant tissue culture: Theory and Practice. Elsevier.
- BUTCHER, S., BICKNELL, R. y BORST, N.** 1986. Propagation of *limonium peregrinum*. The international plant propagators society combined proceedings of annual meetings. 36: 448-450.
- GASPAR, T.** 1995. The concept of cancer *in vitro* plant cultures and the implication to hormones and hyperhydricity. Plant tissue Culture and Biotechnology. Vol.1 No. 3: 126 - 136.
- HARAZY, A., LESHEM, B. y COHEN, A.** 1985. *In vitro* propagation of statice as an aid in breeding. Hortscience 20(3): 361-362.
- KUNITAKE, H. y MILL, M.** 1990. Plant regeneration from cell cultured derived protoplast of statice (*Limonium perezii* H.). Plant Science 70: 115-119.
- LLEDO, M., CRESPO, M. y AMO, J.** 1994. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of three threatened species of *Limonium* from Valencia Community (Spain). Abstracts VIIth International Congress of Plant Tissue Culture. Firenze, Italy.
- MARTÍN, C. y PÉREZ, C.** 1992. Multiplication *in vitro* of *Limonium estevei* Fdez. Annals of Botany 70 (2): 165-167.
- MORGAN, E., BURGE, G., SEELVE, J. y HOPPING, M.** 1994. Embryo rescue of interespecific hybrids between *L. peregrinum* and *L. purpuratum*. Abstracts VIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, Italy.
- MURASHIGE, T y SKOOG, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- OVIDEO, Y. y GUEVARA, E.** 1988. Propagación *in vitro* de la estatice (*Limonium sinuatum* c.v. Midnight blue). Agronomía Costarricense 12(1): 113-122.
- RUIZ, O.** 1990. Propagación vegetativa *in vitro* del estátice (*Limonium sinuatum* Mill). Tesis de grado para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, D.C.
- SALINGER, J.** 1991. Státice. pp 272-273 In: Producción comercial de flores. J. Salinger, ed. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza, España.
- STAFFORD, A. y WARREN, G.** 1991. Plant cell and tissue culture, 1^{ra} edición. Open University Press, London, U.K.
- STEEL, R. y TORRIE, J.** 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos, 2^a edición. McGraw - Hill. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.
- WETZSTEIN, H., KIM, C. y SOMMER, H.** 1994. Vessel volume, gelling agent and basal salts affect pH and gel strength of autoclaved tissue culture media. Hortscience 29(6) : 683-685.
- WICKI, P.** 1992. Mikrovermehrter meerlavendel. Deutscher gartenbau (Germany) 46(12) : 730-733.
- WILFRET, G. y RAULSTON, J.** 1975. Acceleration of flowering of statice (*Limonium sinuatum*) by gibberellic acid (GA₃). Hortscience 10(1) : 37-38.
- ZIMMERMAN, R. H.** 1984. Apple. In: Handbook of plant tissue culture. Vol. 2. MacMillan Publishing Co.