

Efecto de la distancia de la planta al foco emisor de luz durante la fase de multiplicación del cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum*

J. Sánchez^(1,2), A. Calderón⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. España. jesus.tecnologia@hotmail.com

⁽²⁾ Barberet & Blanc, S.A. Puerto Lumbreras, Murcia. España.

RESUMEN

La luz juega un papel fundamental en el desarrollo de las plantas. Aparte de su efecto sobre la acumulación de biomasa a través de la fotosíntesis, la intensidad y la calidad de la luz determinan la forma y el tamaño de la planta. En este trabajo se muestran los resultados del ensayo llevado a cabo para estudiar el comportamiento de dos variedades de color azul de *Limonium sinuatum*, “Aqua Blue” (AQ) y “Duel Violet” (DV), con respecto a la distancia de la fuente emisora de luz durante la fase de multiplicación de su cultivo *in vitro*. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos con diferentes intensidades luminosas, utilizando un medio Murashige and Skoog (MS) suplementado con N⁶-benziladamina (BA), y para cada uno de ellos se midió la radiación fotosintéticamente activa (PAR), cuantificando el flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF). Posteriormente, se tomaron medidas del crecimiento de las plantas, de la tasa de propagación y de la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides). La disminución de la distancia al foco emisor de luz no tuvo ningún efecto negativo sobre las plantas. Así que, la reducción de la distancia entre bandejas dentro de una cámara de cultivo *in vitro*, llevaría a un mejor aprovechamiento del espacio disponible sin perjudicar la calidad de las plantas.

Palabras clave: Intensidad luminosa; limonio; micropropagación; pigmentos fotosintéticos.

1. Introducción

Limonium sinuatum es una especie de la familia de las Plumbagináceas muy apreciada porque tiene un buen mercado tanto para flor seca como para flor en fresco.

Unos de los problemas que presenta esta especie es la obtención masiva de plantas. La propagación convencional de muchos cultivares de *Limonium* se hace por semilla o por esquejes, de manera que la obtención de la planta lleva unos 6 u 8 meses, con un rendimiento limitado (20-30 %) y en muchos casos las plantas obtenidas no son homogéneas. Como alternativa se suele utilizar la propagación *in vitro* o micropropagación, que se realiza en laboratorio bajo condiciones controladas. A pesar de las indudables ventajas que ofrece este método, es necesario solventar una serie de problemas que pueden aparecer y que limitarían el rendimiento del proceso. Además, la explotación comercial de estas técnicas requiere la optimización de una serie de parámetros que, en la mayor parte de los

casos, debe hacerse cultivar por cultivar. Entre los factores que se deben tener en cuenta tenemos el método de establecimiento [1,2], la elección del método de multiplicación, el ajuste de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3], la aparición de hiperhidricidad, etc.

La empresa Barberet & Blanc, S.A. situada en Puerto Lumbreras (Murcia) se dedica, entre otras actividades, a la mejora genética y a la obtención de nuevas variedades de *Limonium sinuatum*. Una parte importante de su esquema productivo está basado en el cultivo *in vitro* de la especie, por lo que es necesario depurar la técnica de micropropagación en todas las fases que comprende el proceso con el fin de conseguir suficientes plantas con la calidad apropiada para obtener la máxima rentabilidad.

En este trabajo se realizó un ensayo de dos variedades de color azul de limonio, “Aqua Blue” y “Duel Violet”, durante la fase de multiplicación *in vitro*, con el objetivo de saber qué efecto tiene la distancia de la fuente emisora de luz a la planta sobre su desarrollo. Esto es importante, ya que

unos de los problemas de los productores de plantas micropropagadas es la limitación de espacio dentro de las cámaras de cultivo, y por este motivo se busca reducir el espacio entre baldas en las estanterías utilizadas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se han utilizado plantas establecidas en cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* de las variedades “Aqua Blue” y “Duel Violet” que se encuentran en la fase de multiplicación.

En esta fase de multiplicación se utilizó un medio de cultivo con la concentración de macro- y micronutrientes descrita por Murashige y Skoog (1962) [4] y suplementada con un 4 % (p/v) de sacarosa, y N⁶-benziladenina (BA) a una concentración de 0,2 mg/L. Posteriormente, el pH de los medios se ajustó a 5,8 y se añadió agar a una concentración del 0,9 % (p/v). El medio se distribuyó en tubos de ensayos y éstos se autoclavaron a 104 KPa y a 121 °C durante 20 min. Todos los cultivos se mantuvieron a 23°C, con un fotoperiodo de 16 h, y diferentes tratamientos de iluminación.

2.2 Tratamientos

Para estudiar el efecto de la distancia de la fuente emisora de la luz se establecieron cuatro tratamientos (Fig. 1). En el T-1 las plantas estaban situadas a 18 cm de distancia, en el T-2 (control, por ser la distancia habitualmente utilizada), T-3 y T-4 estaban a 12,5 cm, 8 cm y 2 cm, respectivamente. Se hizo una correlación entre la distancia al foco emisor y el flujo de fotones fotosintéticos (FFF) (Tabla 1), utilizando un luxómetro ECO LX1010B. A continuación, se usó un coeficiente obtenido de unas tablas de la empresa OSRAM para sus tubos fluorescentes que permite realizar la conversión entre luxes y flujo de fotones fotosintéticos.

2.3 Diseño y análisis estadístico

En este ensayo se cultivaron 25 plantas por variedad, tratamiento y subcultivo. Se realizaron cuatro subcultivos, es decir, cuatro repeticiones. Cada subcultivo tenía una duración de 35 días. Al final de cada periodo se tomaron medidas del crecimiento y de la tasa de propagación de los cultivos. Posteriormente, las muestras fueron congeladas y homogeneizadas en presencia de nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su utilización. La determinación de la concentración

de pigmentos fotosintéticos en el material procedente de cada tratamiento se llevó a cabo en extractos metanólicos usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Las concentraciones se expresan en microgramos de pigmento por gramo de peso fresco, para lo cual se utilizaron las ecuaciones correspondientes descritas en [5]. Los datos recogidos sobre crecimiento, tasa de multiplicación y pigmentos fotosintéticos se trataron estadísticamente.

3. Resultados y Discusión

3.1 Crecimiento y tasa de multiplicación

El crecimiento en las dos variedades al cabo de los 35 días se vio ligeramente afectado por la cercanía al foco emisor de luz, mejorando muy poco en el T-4 con respecto al T-1 (Fig. 1 y Fig. 2). Sin embargo, la tasa de multiplicación sí fue menor para el tratamiento T-4 en Duel Violet (Fig. 3), con respecto al T-4 en Aqua Blue (Fig. 4). Para las dos variedades el número de brotes por tubo varió entre 2,1 y 2,9, dato que no es muy significativo.

3.2 Concentración de clorofilas a, b y carotenoides

La concentración de clorofila a para la variedad Aqua Blue va descendiendo a medida que aumenta el flujo de fotones, de manera que la menor concentración del pigmento se encontró en el T-4. En cambio, para Duel Violet se observó una disminución, seguida de un aumento de los niveles, de forma que la concentración de clorofila a en el T-4 quedó más alta en Duel Violet que en Aqua Blue. Destacar que para el tratamiento T-3 las concentraciones de clorofila a fueron muy similares (Fig. 6).

Los niveles de la clorofila b, mostraron la misma tendencia que la clorofila a en ambas variedades, apareciendo primero una bajada en la concentración para Aqua Blue a medida que aumentaba la iluminación, y un pequeño repunte en el T-4 para Duel Violet (Fig. 7). En la Fig. 7 también se puede observar que los valores de concentración de la clorofila b estuvieron muy próximos para el T-3.

Con respecto a la concentración de carotenoides totales (Fig. 8), se observó que al aumentar la iluminación Aqua Blue presentó una concentración elevada en T-2 para posteriormente bajar su concentración en T-4 de una manera acusada. Sin embargo, en Duel Violet la variación fue muy discreta, elevándose los valores a medida que aumentaba el flujo de

fotones, pero solo de una forma ligera. De nuevo, se pudo observar que para T-3 los valores de carotenoides en ambas variedades estuvieron cercanos, entre 6 y 8 $\mu\text{g/g}$ PF.

4. Conclusiones

Cuando los niveles de pigmentos fotosintéticos son elevados, las plantas presentan una mejor adaptación a las condiciones ambientales del exterior de la cámara de cultivo. Por lo tanto, debería elegirse aquel tratamiento que asegure altas concentraciones de pigmentos, pero manteniendo unas tasas de propagación y una velocidad de crecimiento aceptables.

A pesar de ser consideradas las dos variedades de color azul, no responden igual a los tratamientos. Por lo tanto habría que considerar cada una de las variedades por separado para obtener un óptimo de producción y aclimatación.

Como no es posible establecer unas condiciones individualizadas por variedad en el interior de la cámara de cultivo, debido a los costes, se debe elegir un tratamiento que beneficie más a una, pero sin perjudicar demasiado a la otra, que este caso, parece ser el T-3.

El tratamiento T-3 tiene una distancia menor entre planta y foco emisor de luz que el T-2 (control). Utilizar este T-3 nos haría tener un mayor número de plantas en las cámaras de cultivo, debido a un mejor aprovechamiento del espacio, ya que las baldas de las estanterías podrían estar más juntas.

5. Agradecimientos

Este trabajo está siendo apoyado y financiado por la empresa Barberet & Blanc, S.A. Algunos de los ensayos han sido llevados a cabo en las instalaciones del Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT.

6. Referencias bibliográficas

[1] Igawa, T., Hoshino, Y. & Mii, M. 2002. Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. In *Vitro Cell Dev-Pl.* 38: 157-162.
 [2] Jeong, J.H., Murthy, H.N. & Paek, K. 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. *Plant Cell Tiss. Org.* 65: 123-128.

[3] Xiao, Y. & Kozai, T. 2006. In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. *Sci. Hort-Amsterdam.* 109: 71-77.

[4] Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.

[5] Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. T.* 11: 591-592.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Iluminación recibida por el material vegetal en los distintos los tratamientos

Tratamiento	Distancia (cm)	FFF ($\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$)
T-1	18,0	96,9
T-2	12,5	99,6
T-3	8,0	101,2
T-4	2,0	102,7

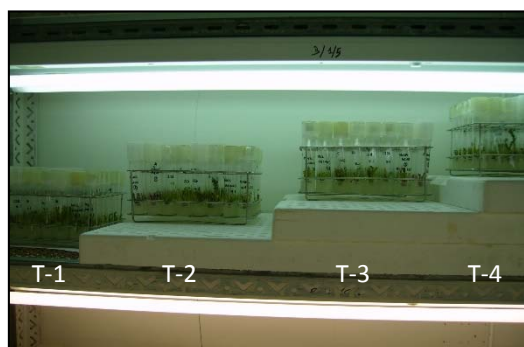


Figura 1. Disposición de los tratamientos en el ensayo

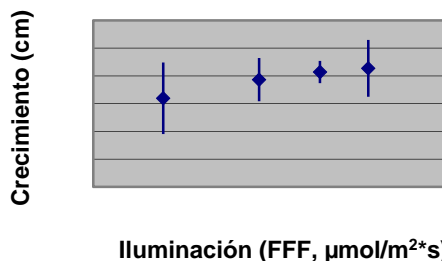


Figura 2. Efecto de la iluminación sobre el crecimiento de *Duel Violet*

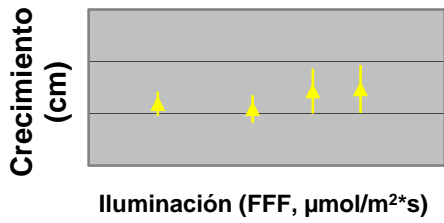


Figura 3. Efecto de la iluminación sobre el crecimiento de Aqua Blue

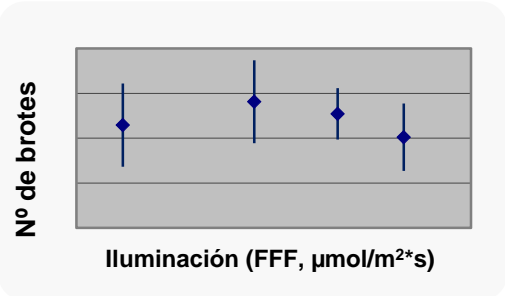


Figura 4. Efecto de la iluminación sobre la tasa de multiplicación Duel Violet

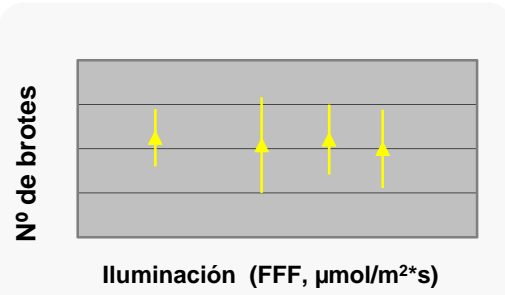


Figura 5. Efecto de la iluminación sobre la tasa de multiplicación Aqua Blue

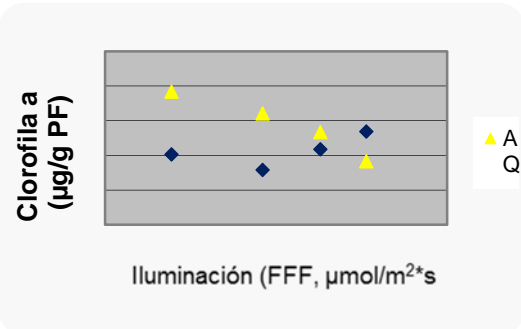


Figura 6. Efecto de la iluminación sobre los niveles de clorofila a en Duel Violet (DV) y Aqua Blue (AQ)

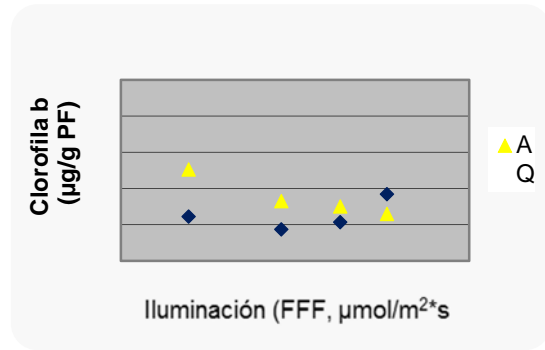


Figura 7. Efecto de la iluminación sobre los niveles de clorofila b en Duel Violet (DV) y Aqua Blue (AQ)

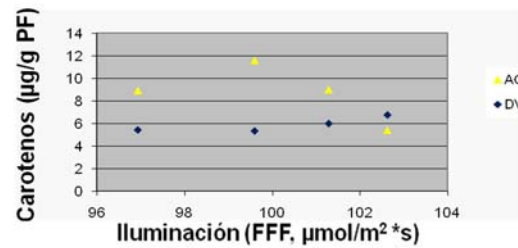


Figura 8. Efecto de la iluminación sobre los niveles de carotenoides en Duel Violet (DV) y Aqua Blue (AQ)