

Effect of temperature during on *in vitro* multiplication of *Limonium sinuatum*

Efecto de la temperatura sobre la fase de multiplicación *in vitro* de *Limonium sinuatum*

J. Sánchez*^{1,2}, A.A. Calderón¹

¹Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Spain.

²Barberet & Blanc, S.A. Puerto Lumbreras, Murcia. Spain.

Abstract

Temperature is one of the most important factors in the multiplication phase in the tissue culture of *Limonium sinuatum*. This factor has an effect on the speed of growth and multiplication rate. This paper shows the performance results of a trial of four varieties of statics of different colours, SN9001, SN8946, SN9000, SN9013, grown in Murashige and Skoog basal medium (MS) supplemented with N⁶-benzilademinina (BA) at temperatures of 4 °C , 12 °C and 22 °C. Among the determinations, measurements of plant growth and propagation rate were taken. Production and stem length during the greenhouse cultivation was also measured. The results obtained show that the effects produced by temperature depend on the studied variety, in such a way that for each one of them it is possible to subcultivate it at a specific temperature so that it increases the subcultivation period, lowering the labor requests, and without harming either to the production or to the values needed in the parameters of quality.

Keywords: statice; micropropagation; production.

Resumen

La temperatura es uno de los factores más importantes en la fase de multiplicación en el cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum*. En términos generales este factor afecta, especialmente, a la velocidad de crecimiento y a la tasa de multiplicación. Este trabajo muestra los resultados del comportamiento de un ensayo de cuatro variedades de limonio de distintos colores, SN9001, SN8946, SN9000, SN9013, cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con N⁶-benziladenina (BA) a temperaturas de 4 °C, 12 °C y 22 °C. Entre las determinaciones realizadas, se tomaron medidas del crecimiento de las plantas y de la tasa de propagación. También se midió la producción y la longitud del tallo durante la fase de cultivo en invernadero. Los resultados obtenidos muestran que el efecto de la temperatura depende de la variedad estudiada, de manera que para cada una de ellas es posible subcultivar a una determinada temperatura para aumentar el periodo de subcultivo, bajando los requerimientos de mano de obra, y sin perjudicar a la producción ni a los valores requeridos en los parámetros de calidad estudiados.

Palabras clave: limonio; micropropagación; producción.

* E-mail: jesus.tecnologia@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Limonium sinuatum es una especie de la familia de las Plumbagináceas. Esta planta es muy valorada por el mercado tanto para flor seca como para flor en fresco. Esta especie presenta algunos problemas con respecto a la propagación masiva de plantas empleando técnicas convencionales.

La producción de *Limonium* se realiza por semilla o esqueje, de forma que para obtener una planta se necesitan entre 6 y 8 meses, con rendimientos bajos (20-30%) y en muchas ocasiones las plantas no presentan homogeneidad. Como alternativa se suele utilizar la propagación *in vitro* o micropropagación, que se realiza en laboratorio bajo condiciones controladas. La explotación comercial de estas técnicas requiere la optimización de una serie de parámetros. Entre los factores que se deben tener en cuenta se incluyen el método de establecimiento [1,2], la elección del método de cultivo, el ajuste de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3], la posible 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 del proceso.

En este trabajo se describe el ensayo realizado con cuatro variedades de limonio de diferentes colores, SN9001 (rosa), SN8946 (violeta), SN9000 (amarillo) y SN9013 (blanco), con el objetivo de conocer el efecto que tiene la temperatura sobre la fase de multiplicación y la etapa posterior de cultivo en invernadero. Esto es importante, ya que uno de los problemas que se plantean en la micropropagación de la especie es el cómo alargar entre subcultivos, de forma que se pueda controlar mejor la producción con un ahorro en los costes de mano de obra. El fin último de este ensayo es conseguir, durante la etapa de cultivo *in vitro* de limonio, un crecimiento y una producción total de plantas similares a las obtenidos en las condiciones de control (a mayor temperatura), pero aumentando el tiempo entre subcultivos, y obteniendo valores altos en los parámetros de producción y de calidad durante el cultivo en invernadero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se utilizaron plantas establecidas en cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* de las variedades SN9001, SN8946, SN9000, SN9013 y que se encontraban 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 suplementado 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 22 °C y un fotoperiodo de 16 h.

2.2 Tratamientos y análisis estadístico

Para estudiar el efecto de la temperatura se establecieron tres tratamientos para cada una de las variedades. En el tratamiento 1 (T-1) las plantas se mantuvieron a 4 °C durante tres meses, el tratamiento 2 (T-2) las plantas estuvieron a 12 °C durante tres meses, y el tratamiento 3 (T-3) las plantas se subcultivaron a 22 °C por un periodo de un mes (control). Se cultivaron 20 plantas por variedad y tratamiento con tres repeticiones. En la fase de multiplicación se tomaron medidas

del crecimiento a los 40 y 90 días, para T-1 y T-2, y a los 35 días para T-3; y de la tasa de propagación al finalizar el subcultivo. Durante la fase de cultivo en invernadero se tomaron medidas sobre la producción (tallos/planta) y, longitud del tallo (cm), determinando así la calidad agronómica y comercial. Todos los datos recogidos fueron estudiados con un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa IBM SPSS Statistics 20 con un nivel de significación $\alpha=0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Crecimiento y tasa de multiplicación

El crecimiento a los 40 días para todas las variedades no presentó diferencias entre T-1 y T-2 (Tabla 1). Para SN9001, SN8946 y SN9013 el crecimiento a 4 °C fue menor que para las otras temperaturas, sin embargo en SN9000 no se observaron diferencias significativas entre los crecimientos al final del periodo de subcultivo. Con respecto a la tasa de multiplicación no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las variedades.

3.2 Producción y parámetros de calidad

En la variedad SN9001 la producción para T-1 y T-2 estuvo por debajo de lo exigido (>8 tallos/planta). Para SN8946 solo el tratamiento de 4 °C presentó una producción baja, estando los otros tratamientos por encima. Para SN9000 y SN9013, las producciones estuvieron por encima de lo exigido. En cuanto a la longitud del tallo, se puede apreciar en la Figura 2 que el T-3 en SN9001 presentó diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, aunque todas estuvieron por encima de 60 cm. Para las otras variedades no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, situándose SN8946 y SN9000 en todas las temperaturas cerca de lo exigido, SN9013 presentó, incluso, tallos más largos de lo requerido.

4. CONCLUSIONES

En la variedad SN9001 se aprecia un crecimiento parecido a 12 °C y 22 °C, y superior a 4 °C, siendo la tasa de multiplicación similar en todos los tratamientos. Sin embargo, la producción para los tratamientos 1 y 2 está por debajo de lo exigido. En consecuencia, se considera continuar con el subcultivo a la temperatura de 22 °C para esta variedad.

Para la variedad de color violeta SN8946, el crecimiento del tratamiento 1 es menor. También se observa para ese tratamiento una menor producción. Además, como en los tratamientos 2 y 3 los datos son similares y acorde a los exigidos se podría pasar a realizar los subcultivos a una temperatura de 12 °C

En la variedad SN9000, de color amarillo, no se ven diferencias en cuanto al crecimiento y a la tasa de multiplicación entre tratamientos. Sin embargo, la producción para el tratamiento de 4 °C es menor. Por este motivo, y debido a que los parámetros de calidad para los otros tratamientos se mantienen de acuerdo a lo exigido, esta variedad se puede pasar a subcultivar a 12 °C.

Para la variedad SN9013, el crecimiento y tasa de multiplicación son mayores en los tratamientos de 12 °C y 22 °C, siendo aceptables los datos de tratamiento de 4 °C. Como no se aprecian diferencias entre tratamientos respecto a los parámetros de calidad, se considera que se podría subcultivar a 4 °C o a 12 °C.

5. AGRADECIMIENTOS

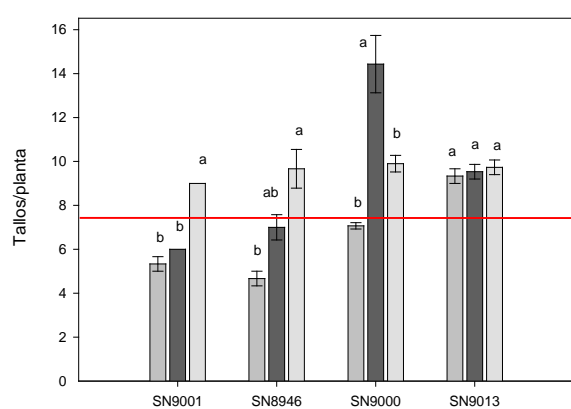
Este trabajo está siendo apoyado y financiado por la empresa Barberet & Blanc, S.A. Algunos de los ensayos han sido llevados a cabo en las instalaciones del Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT.

6. REFERENCIAS

- [1] Igawa, T., Hoshino, Y. and Mii, M. (2002). Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 38: 157-162.
- [2] Jeong, J.H., Murthy, H.N. and Paek, K. (2001). High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. *Plant Cell Tissue. Organ Cult.* 65: 123-128.
- [3] Xiao, Y. and Kozai, T. (2006). In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. *Sci. Hortic.* 109: 71-77.
- [4] Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

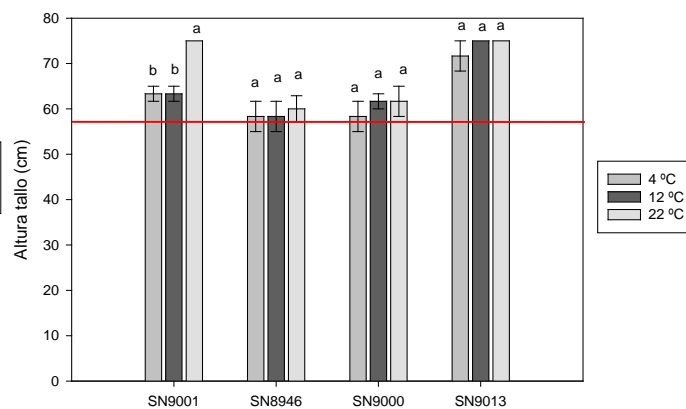
Tabla 1. Crecimiento y tasa de multiplicación de las variedades de limonio estudiadas.

Variedades	Temperaturas	Crecimiento 40 días (cm)	Crecimiento 90 o *35 días (cm)	Tasa de multiplicación (Nº brotes/planta)
SN9001	4°C	2.84 ± 0.24a	3.25 ± 0.22a	1.35 ± 0.13a
	12°C	3.61 ± 0.31a	5.94 ± 0.62b	1.47 ± 0.15a
	22°C	---	5.72 ± 0.43b*	1.61 ± 0.23a
SN8946	4°C	3.26 ± 0.38a	3.86 ± 0.41a	2.17 ± 0.48a
	12°C	4.41 ± 0.21a	7.39 ± 0.99b	1.94 ± 0.27a
	22°C	---	6.45 ± 0.18b*	2.17 ± 0.17a
SN9000	4°C	3.25 ± 0.31a	3.67 ± 0.33a	1.94 ± 0.31a
	12°C	3.27 ± 0.21a	4.68 ± 0.41a	2.29 ± 0.15a
	22°C	---	4.55 ± 0.07a*	2.07 ± 0.17a
SN9013	4°C	4.57 ± 0.18a	5.28 ± 0.22a	1.89 ± 0.04a
	12°C	5.81 ± 0.04b	8.87 ± 0.47b	2.17 ± 0.56a
	22°C	---	7.72 ± 0.27b	2.07 ± 0.11a



La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta)

Figura 1. Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre la producción de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero.



La línea indica la longitud mínima para la calidad extra (60 cm)

Figura 2. Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre la longitud del tallo de plantas crecidas en condiciones de invernadero.