

## Shoot induction and plant regeneration of *Limonium sinuatum* from young leaves

## Inducción de brotes y regeneración de plantas de *Limonium sinuatum* a partir de hojas jóvenes

J. Sánchez<sup>1,2\*</sup>, A. A. Calderón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Spain.

<sup>2</sup>Barberet & Blanc, S.A. by Dümmen Orange. Puerto Lumbreras, Murcia. Spain.

\*jesus.tecnologia@hotmail.com

### Abstract

The success of micropropagation of *Limonium sinuatum* depends on the establishment phase. The most suitable explant should be selected to ensure a good introduction to laboratory conditions. This paper presents the results of the tests carried out with four varieties of different colours of *L. sinuatum*, SN8946, SN9013, SN9000 and SN9001, using as starting material 5 x 5 mm pieces taken from young leaves as an alternative to the immature inflorescences. The explants were tested in four treatments with Murashige and Skoog (MS) culture media supplemented with different concentrations of the cytokinins N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) or Thidiazuron (TDZ), in the presence or absence of the auxin indoleacetic acid (AIA). Among the determinations made were the percentage of contaminated explants and surviving explants, the percentage of explants with callus and that of tubes with plants. Stem production and length were also measured during the greenhouse culture phase. The establishment using young leaves was only viable for the SN9000 variety, showing the best results when the medium was supplemented with BA and AIA, thus establishing an alternative to the current method.

**Keywords:** Statice; *in vitro* establishment; Thidiazuron.

### Resumen

El éxito de la micropropagación de *Limonium sinuatum* depende de la fase de establecimiento. Se debe seleccionar el explante más idóneo para asegurar una buena introducción a las condiciones de laboratorio. Este trabajo presenta los resultados de los ensayos realizados con cuatro variedades de distintos colores de *L. sinuatum*, SN8946, SN9013, SN9000 y SN9001, usando como explante de partida trozos de 5 x 5 mm obtenidos de hojas jóvenes como alternativa a las inflorescencias inmaduras. Los explantes se ensayaron en cuatro tratamientos con medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementados con diferentes concentraciones de las citoquininas N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) y Thidiazuron (TDZ), en presencia o ausencia de la auxina ácido indolacético (AIA). Entre las determinaciones realizadas, se tomaron medidas del porcentaje de explantes contaminados, de explantes supervivientes, de explantes con callo y de tubos con plantas. También se midió la producción y la longitud del tallo durante el cultivo en invernadero. El establecimiento utilizando hojas jóvenes sólo fue viable para la variedad SN9000, mostrando los mejores resultados cuando el medio fue suplementado con BA y AIA, estableciéndose así una alternativa al método usado en la actualidad.

**Palabras clave:** Limonio; establecimiento *in vitro*; Thidiazuron.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Limonium sinuatum*, especie perteneciente a la familia de las Plumbagináceas es muy apreciada tanto para su venta como flor seca como para flor en fresco.

En la producción comercial de esta especie se usaban semillas o esquejes, pero el periodo necesario para obtener plantas oscilaba entre 6-8 meses, con rendimientos bajos y gran heterogeneidad [1]. Por este motivo, actualmente, se multiplican las plantas en laboratorio bajo condiciones controladas usando la propagación *in vitro* o micropropagación. Para utilizar esta técnica se requiere optimizar todas las fases, desde el método de establecimiento [2], a la elección del método de cultivo, pasando por la composición de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3].

La empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümme Orange localizada en el municipio de Puerto Lumbreras (Murcia), lleva a cabo entre sus actividades, la mejora genética y obtención de variedades nuevas de *Limonium sinuatum*. Como para el establecimiento y multiplicación se utilizan técnicas *in vitro*, es muy importante mejorar todas las fases de la micropropagación.

El objetivo de este trabajo es conocer si se puede proponer un método alternativo de establecimiento *in vitro* a partir de explantes de hojas jóvenes que sustituya al protocolo actualmente usado, basado en la utilización de inflorescencias inmaduras, eliminando así el problema que supone la variación somaclonal y manteniendo un elevado porcentaje de éxito en el proceso. Se han realizado los ensayos con cuatro variedades de distintos colores SN8946 (violeta), SN9013 (blanco), SN9000 (amarillo) y SN9001 (rosa), siendo solamente la variedad amarilla la que respondió de manera satisfactoria.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

El material de partida se tomó de plantas adultas de las cuatro variedades descritas y cultivadas en invernadero, de las que se seleccionaron hojas jóvenes de 2 cm de longitud. Estas hojas se esterilizaron siguiendo un protocolo que consistió en un lavado con agua y jabón, 30 segundos en alcohol de 70°, 15 minutos en una disolución de hipoclorito sódico al 1% y por último, tres enjuagues con agua destilada y estéril. De estas hojas se tomaron trozos de 5 x 5 mm incluido el peciolo para ensayarlos en los distintos tratamientos. Las condiciones de la cámara de cultivo durante el establecimiento fueron de 22 °C, humedad relativa de 45-50%, iluminación de 96,2  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , concentración de  $\text{CO}_2$  ~800 ppm y un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad).

Al finalizar el periodo de establecimiento, el material obtenido se propagó en las mismas condiciones de temperatura, iluminación, concentración de  $\text{CO}_2$  y humedad relativa.

### 2.2 Tratamientos y análisis estadístico

Como medio de cultivo basal se utilizó el descrito por Murashige y Skoog (MS) [4]. El pH del medio se ajustó a 5,8, con una concentración de agar del 0,9% (p/v) y se autoclavó a 121 °C y 104 kPa. Los explantes foliares se sometieron a los siguientes tratamientos: T-1, con una concentración de BA de 0,25 mg/L como citoquinina (control, usado normalmente como medio de establecimiento), T-2, con TDZ a una concentración de 0,25 mg/L, T-3, con 0,25 mg/L de BA más 0,50 mg/L de AIA, y T-4, con 0,25 mg/L de TDZ más 0,50 mg/L de AIA. Cada experimento se repitió tres veces, utilizando 25 explantes por tratamiento y variedad. Al finalizar la fase de establecimiento (60 días) se calculó el porcentaje de explantes contaminados y supervivientes, de explantes con callo y de tubos con plantas. Los nuevos brotes se subcultivaron durante 35 días en un medio MS modificado con 0,20 mg/L de BA. En la fase de cultivo en invernadero se midió la producción (tallos/plantas) y longitud del tallo (cm) para determinar la calidad agronómica y comercial. Todos los datos 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 Contaminaciones y establecimiento

En las variedades SN8946, SN9013 y SN9001 el valor más alto de explantes supervivientes estuvo siempre por debajo del 16% (T-4 en SN9013), no apareciendo ninguna planta para estos tratamientos en ninguno de estos cultivares (Tabla 1).

Para la variedad SN9000 el porcentaje de contaminaciones estuvo por debajo del 30%, un valor muy significativo, si se tiene en cuenta que en el establecimiento a partir de inflorescencia inmadura este valor está sobre el 50-60%. Así, la supervivencia de explantes estuvo por encima del 70% para todos los tratamientos. A pesar de esto, el T-1 tuvo un número de explantes con callo muy bajo, estando el resto de tratamientos cercanos al 25%, como T-2 y T-4, y por encima de este valor en T-3. Además, se observó que solamente los tratamientos T-2 con un 14,62% de los tubos y el T-3 con un 31,93% de los tubos, mostraron plantas que pasaron a la fase siguiente para realizar una posterior multiplicación (Tabla 1).

#### 3.2 Crecimiento, tasa de multiplicación, peso fresco y peso seco

La variedad SN9000 presentó datos de crecimiento similares entre tratamientos de manera que las variaciones estuvieron entre 1,98 y 2,55 centímetros sin mostrar diferencias significativas. Sin embargo, si hubo diferencias entre el método utilizado comercialmente, basado en inflorescencias, y el T-3 con respecto a la tasa de multiplicación (Tabla 2). Aun así el T-3, con 1,20 brotes por planta, se puede considerar aceptable.

En cuanto al peso fresco y peso seco se observó que no había diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (Tabla 2).

#### 3.3 Producción y parámetros de calidad

La producción en el tratamiento control (aplicado a inflorescencias) y T-2 con BA y con BA más AIA, respectivamente, no llegó al valor de 8 tallos por planta y corte que se exige comercialmente, si bien se obtuvieron valores muy cercanos (7,5 y 7). El T-3 superó el valor esperado, presentando diferencias significativas con el T-2 (Figura 1).

Todas las plantas de los distintos tratamientos de la variedad ensayada SN9000 de color amarillo presentaron una altura de tallo por encima de 60 centímetros (Figura 2), cumpliendo con la calidad extra. Además, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

### 4. CONCLUSIONES

Para las variedades SN8946, SN9013 y SN9001 este método de introducción, con los fitorreguladores y dosis ensayadas, no es efectivo para un establecimiento *in vitro* adecuado.

En cuanto a la variedad de color amarillo, SN9000, se observa que los tratamientos T-2 y T-3 son efectivos para la regeneración de plantas a partir de hojas jóvenes. Además, como solo se observan diferencias en los parámetros de calidad, con una producción más alta para T-3, este tratamiento se podría adoptar como un nuevo método de establecimiento para la variedad.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está siendo financiado por la empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümmer Orange. También se han utilizado las instalaciones del Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Fujita, M. 1993. Breeding and Cultivation: *Stactice* (*Limonium*). (Seibunndo-Shinkosha Co. Ltd. Tokyo). Pp 136-150.
- [2] Igawa, T., Hoshino, Y. and Mii, M. 2002. Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental *stactice*, *Limonium sinuatum* Mill. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 38: 157-162.
- [3] Jeong, J.H., Murthy, H.N. and Paek, K. 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of *stactice*. *Plant Cell Tissue. Organ Cult.* 65: 123-128.
- [4] Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

**Tabla1.** Parámetros de establecimiento *in vitro* a partir de explantes de hojas jóvenes.

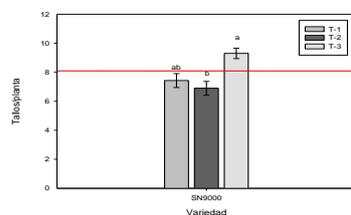
Variedad	Tratamiento	Contaminados 60 días (%)	Explantes supervivientes (%)	Explantes con callo (%)	Tubos con plantas (%)
SN8946	T-1	70.69 ± 3.39a	29.31 ± 3.39b	1.39 ± 0.95a	0.00 ± 0.00a
	T-2	54.89 ± 1.37b	45.10 ± 1.37a	2.90 ± 1.45a	0.00 ± 0.00a
	T-3	77.55 ± 2.99a	22.45 ± 2.99b	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
	T-4	54.63 ± 2.4b	45.37 ± 2.45a	1.39 ± 1.39a	0.00 ± 0.00a
SN9013	T-1	13.72 ± 3.71b	86.28 ± 3.07a	6.83 ± 2.31bc	0.00 ± 0.00a
	T-2	37.20 ± 3.17a	62.80 ± 3.16b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00a
	T-3	14.35 ± 2.96ab	85.65 ± 2.96a	10.34 ± 1.46ab	0.00 ± 0.00a
	T-4	13.12 ± 2.96b	86.88 ± 2.96a	16.20 ± 2.81a	0.00 ± 0.00a
SN9000	T-1	29.09 ± 3.02a	70.91 ± 3.02b	6.52 ± 1.74b	0.00 ± 0.00c
	T-2	28.00 ± 2.31a	72.00 ± 2.31b	24.00 ± 6.11ab	14.67 ± 2.67b
	T-3	5.23 ± 2.61b	94.77 ± 2.61a	39.83 ± 3.71a	31.93 ± 1.57a
	T-4	24.07 ± 2.58a	75.93 ± 2.58b	25.15 ± 2.54ab	0.00 ± 0.00c
SN9001	T-1	64.99 ± 6.04a	35.01 ± 6.04a	1.39 ± 1.39ab	0.00 ± 0.00a
	T-2	55.01 ± 2.93ab	44.98 ± 2.93a	2.90 ± 1.45ab	0.00 ± 0.00a
	T-3	51.71 ± 2.77ab	48.29 ± 2.77a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
	T-4	62.41 ± 2.22b	37.58 ± 2.22a	7.37 ± 0.56a	0.00 ± 0.00a

\*Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre los valores (Tukey HSD, p<0.05)

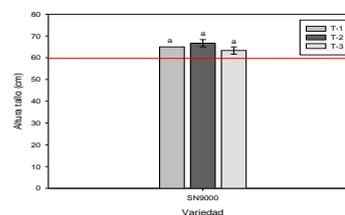
**Tabla2.** Parámetros de multiplicación *in vitro* de SN9000.

Tratamiento	Crecimiento (cm)	Tasa de multiplicación (brotes/planta)	Peso fresco (g/planta)	Peso seco (g/planta)
Comercial	1.98 ± 0.01a	1.44 ± 0.06a	1.09 ± 0.24a	0.07 ± 0.01a
T-2	2.08 ± 0.06a	1.23 ± 0.02ab	2.49 ± 0.83a	0.16 ± 0.04a
T-3	2.55 ± 0.34a	1.20 ± 0.06b	1.29 ± 0.32a	0.09 ± 0.02a

\*Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre los valores (Tukey HSD, p<0.05)



**Figura 1.** Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes sobre la producción de SN9000 en plantas cultivadas en invernadero.



**Figura 2.** Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes sobre la longitud del tallo de SN9000 en plantas cultivadas en invernadero.