

Multiplicación "in vitro" en remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) II. Vitrificación del material

Por A. CASAS y J. M. LASA

Estación Experimental de Aula Dei, ZARAGOZA

Recibido el 27-IX-1986

ABSTRACT

Casas, A. and J.M. Lasa, 1986. In vitro multiplication in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) II. Vitrification of the material. *An. Aula Dei*, 18 (1-2): 57-63.

Frequency and growth of vitrified shoots have been studied, concluding the great complexity of the phenomenon. Hormone content in the media has a big influence on vitrification. The growth of the vitrified material is characterised by an increase in fresh weight in connection with a clear decrease of the multiplication rate.

INTRODUCCION

La vitrificación es un problema asociado con la propagación "in vitro" de gran número de especies, tanto leñosas como herbáceas. En ciclos repetidos de multiplicación suelen aparecer un porcentaje de los cultivos con hojas translúcidas, gruesas, frecuentemente elongadas, en un estado hiperhídrico y con un crecimiento anormal, reduciéndose la lignificación en especies leñosas (Vieth et al., 1983; Vieitez et al., 1985). Los brotes prácticamente no se multiplican y eventualmente mueren (Pasqualetto et al., 1986).

Se han mencionado como posibles causas de este fenómeno: el potencial hídrico del medio, particularmente afectado por la concentración de agar (Debergh et al., 1981; Debergh, 1983), una alta concentración de citoquinina (Bornman y Vogelmann, 1984), la producción de etileno (Kevers et al., 1984), o un alto contenido de ión amonio en el medio de cultivo (Daguin y Letouzé, 1985, 1986).

Diversos autores han descrito la formación de brotes vitrificados en remolacha azucarera (Miedema, 1982; Ranalli et al., 1983; Keimer, 1985), normalmente asociada a cultivares monogérmenes, y posiblemente ocasionada por altas concentraciones de citoquinina, tanto en el medio inicial como en el de multiplicación.

Durante la realización de un estudio más amplio sobre multiplicación

vegetativa en *Beta vulgaris* L. (Casas, 1987), se observó la aparición de brotes vitrificados en proporciones variables. En el presente trabajo se analizan los diversos factores que pueden ocasionar la aparición de este fenómeno, y se describe el comportamiento de los brotes vitrificados.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización del presente trabajo se han empleado tres poblaciones de orígenes diversos; AD-102, holandesa, diploide, de alta producción y multigermen; FC-603, americana, diploide, con alto contenido en azúcar y monogermen y AD-41, polaca, diploide, de tipo intermedio y multigermen.

Como explante se utilizaron yemas apicales, 3-5 mm de longitud, procedentes de plantas al inicio de su espigado. Fueron esterilizadas por inmersión en Cl_2Hg al 1% 1 min, 3 lavados en agua destilada estéril de 2, 30 y 30 min, y $(\text{ClO})_2\text{Ca}$ al 1% 10 min, con siembra directa sin lavar el material.

El medio basal utilizado (MB) contiene las sales minerales descritas por Murashige y Skoog (1962) y cuatro vitaminas, clorhidrato de tiamina $3 \mu\text{M}$, clorhidrato de piridoxina $2,4 \mu\text{M}$, ácido nicotínico $4 \mu\text{M}$ y mio-inositol $555 \mu\text{M}$.

Los explantes se sembraron en tres medios de cultivo distintos:

1. MB + BA $0,2 \mu\text{M}$
2. MB + BA $4,4 \mu\text{M}$ + ANA $0,5 \mu\text{M}$ + GA_3 $0,3 \mu\text{M}$
3. MSMA (tiamina $1,2 \mu\text{M}$, inositol $555 \mu\text{M}$, Adenina SO_4 $200 \mu\text{M}$, 2iP $150 \mu\text{M}$, AIA $1,7 \mu\text{M}$).

Como puede apreciarse, se comparan el medio basal casi sin hormonas, con otro que tiene un fuerte contenido hormonal y con un medio preparado (Gibco), Murashige Shoot Multiplication Medium A (MSMA), desarrollado por Huang y Murashige (1976).

El material procedente de cada uno de esos medios iniciales se cultivó en cinco medios de multiplicación; el medio basal con diferentes concentraciones hormonales y dos medios preparados (Gibco), Murashige Shoot Multiplication Medium B (MSMB) y Murashige Minimal Organics Medium (MMOM), desarrollados también por Huang y Murashige (1976), que se detallan a continuación:

1. MB + BA $0,2 \mu\text{M}$
2. MB + BA $2,2 \mu\text{M}$
3. MB + BA $4,4 \mu\text{M}$
4. MSMB (tiamina $1,2 \mu\text{M}$, inositol $555 \mu\text{M}$, Adenina SO_4 $200 \mu\text{M}$, KIN $9,3 \mu\text{M}$, AIA $11,4 \mu\text{M}$)
5. MMOM (tiamina $1,2 \mu\text{M}$, inositol $555 \mu\text{M}$) + BA $0,9 \mu\text{M}$.

Se realizaron dos subcultivos en estos medios, con una duración de 21 días cada uno de ellos.

La fuente de carbono utilizada es sacarosa 88 mM, y se incorporaron 6 g/L de agar-agar (Quimigranel), antes de esterilizar en autoclave 15 min, 120°C y 1 atm.

Los cultivos, realizados en tubos (Bellco) de 25 × 150 mm, conteniendo 20 ml de medio, se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 25°C, con un fotoperíodo de 16 h luz y una iluminación de 15 μmol/m² s.

El estudio se ha centrado en la fase de multiplicación, anotándose la presencia o ausencia de vitrificación, que se expresa en forma de porcentaje, así como dos parámetros para cuantificar el crecimiento del material: incremento de peso fresco, en gramos, y tasa de multiplicación o número de brotes producidos por cada yema cultivada.

Se ha realizado análisis de varianza factorial (Norusis, 1986) y pruebas de comparación de medias, dos a dos y múltiple (Waller y Duncan, 1969).

RESULTADOS Y DISCUSION

Con objeto de estudiar las posibles causas que provocan la vitrificación se realizó el análisis factorial que se presenta en el cuadro 1. Se puede apreciar que hay diferencias significativas entre todos los factores estudiados; todas

CUADRO 1.— *Análisis de varianza factorial del porcentaje de vitrificación.*

Fuente de variación	G.L.	Varianza
Cultivar	2	0.671 ** (1)
Medio inicial	2	1.923 **
Medio multiplicación	4	1.074 **
Subcultivos	1	0.510 *
Cultiv x M.I.	4	0.445 **
Cultiv x M.M.	8	0.807 **
Cultiv x Subc.	2	0.233 *
M.I. x M.M.	8	0.808 **
M.I. x Subc.	2	0.716 **
M.M. x Subc.	4	0.220 *
C x M.I. x M.M.	16	0.710 **
C x M.I. x Subc.	4	0.179 *
C x M.M. x Subc.	8	0.187 *
M.I. x M.M. x Subc.	8	0.094
Error	1219	0.074

(1) *, ** significativo para $\alpha = 0.05, 0.01$

las interacciones dobles son significativas e incluso alguna triple, lo que refleja la complejidad de este fenómeno.

En el cuadro 2, se presentan las frecuencias de vitrificación en tanto por ciento. Se aprecian diferencias significativas entre cultivares, con una menor incidencia en la línea monogermen FC-603, lo que está en contradicción con los resultados de otros autores (Miedema, 1982; Ranalli et al., 1983; Keimer, 1985), que definieron los materiales monogérmes como más propensos a la vitrificación.

CUADRO 2.— *Valores promedio de la frecuencia de vitrificación.*

Factor	Núm.	Media (1)	
<u>Cultivar</u>			
AD-102	400	15.2	c
FC-603	468	7.5	a
AD-41	425	12.2	b
<u>Medio inicial</u>			
1	422	18.9	b
2	446	6.0	a
3	425	8.0	a
<u>Medio multiplicación</u>			
1	282	3.2	a
2	282	11.3	c
3	270	18.1	d
4	221	7.2	b
5	238	17.2	d
<u>Subcultivo</u>			
1	469	8.1	a
2	824	13.1	b

(1) valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

También se han encontrado diferencias significativas entre medios de cultivo, correspondiendo las frecuencias más altas al material procedente del medio inicial 1, y en los medios de multiplicación 3 y 5, y los menores para el material que proviene del medio inicial 2, y en el medio de multiplicación 1.

En otras especies se ha descrito que la vitrificación está relacionada con el contenido de ión amonio en el medio de cultivo (Vieitez et al., 1983;

Daguin y Letouzé, 1985), especialmente cuando se utiliza el medio de Murashige y Skoog (1962), con una alta concentración de nitrógeno en forma amoniacal (20,62 mM). En nuestro caso, todos los medios de cultivo empleados se basan en la composición mineral de dicho medio MS, por lo que las diferencias en el porcentaje de vitrificación según medios de cultivo, deben ser causadas por otros factores.

Las variaciones en la composición vitamínica entre los medios estudiados, no parecen afectar a la vitrificación, confirmando lo expuesto por Keimer (1985).

En cuanto a la concentración hormonal, Debergh (1983) postuló que en un medio con baja concentración de agar, las citoquininas pueden inducir la aparición de la vitrificación, hecho, posteriormente refrendado por otros autores (Bornman y Vogelmann, 1984; Pasqualetto et al., 1986).

Nuestros resultados muestran claramente esta influencia hormonal, con un aumento progresivo de vitrificación entre los medios de multiplicación 1, 2 y 3, confirmando lo descrito en remolacha azucarera (Ranalli et al., 1983; Miedema, 1984), en el sentido de que la vitrificación parece estar relacionada con la concentración de citoquinina durante la formación de los brotes, y la reducción del contenido de dicha hormona, en la fase de multiplicación, conduce a una disminución de la vitrificación.

Finalmente se quiso comprobar el efecto de la vitrificación sobre el creci-

CUADRO 3.— Comparación de los valores promedio de incremento de peso fresco (g) y tasa de multiplicación entre brotes normales vs vitrificados.

Cultivar	Incremento de peso				
	N1	N2	Media 1	Media 2	t
AD-102	339	61	1.00	1.36	2.39 **
FC-603	433	35	0.79	2.98	6.00 ***
AD-41	373	52	0.93	1.24	1.62
Total	1145	148	0.90	1.70	5.78 ***

Cultivar	Tasa de multiplicación				
	N1	N2	Media 1	Media 2	t
AD-102	339	61	2.33	0.62	11.63 ***
FC-603	433	35	1.95	0.68	4.60 ***
AD-41	373	52	2.23	0.40	13.20 ***
Total	1145	148	2.15	0.56	17.27 ***

1: no vitrificados, 2: vitrificados; **, *** ($\alpha=0.01, 0.001$)

miento de los cultivos, presentándose en el cuadro 3 los resultados de material no vitrificado (1) vs vitrificado (2).

La vitrificación conlleva un aumento de peso del material, debido al engrosamiento del mismo, aunque los resultados varían de unos cultivares a otros; sin embargo, se constata que hay una fuerte disminución de la tasa de multiplicación, confirmando lo descrito en otras especies (Debergh et al., 1981; Vieitez et al., 1985).

En algunos casos, al subcultivar yemas vitrificadas, se produjeron brotes axilares normales, a partir de las mismas, aunque esta capacidad de recuperar el material disminuye en función del grado de vitrificación del mismo.

CONCLUSIONES

La vitrificación es un fenómeno complejo, influido por gran cantidad de factores.

Hay un efecto de las hormonas especialmente citoquininas, sobre la aparición de la vitrificación.

La vitrificación conlleva un aumento de peso fresco, debido al engrosamiento del material, y una clara disminución de la tasa de multiplicación.

Es posible recuperar brotes normales a partir de material vitrificado.

RESUMEN

Se ha estudiado la aparición y crecimiento de brotes vitrificados, poniéndose de manifiesto la gran complejidad del fenómeno. Se ha comprobado que la composición hormonal tiene un claro efecto sobre la frecuencia de vitrificación, y que el crecimiento del material vitrificado se caracteriza por un aumento de peso y una clara disminución de la tasa de multiplicación.

REFERENCIAS

- Bornman, C.H. and T.C. Vogelmann, 1984. Effect of the rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification "in vitro" in *Picea abies*. *Physiol. Plant.*, 61: 502-512.
- Casas, A., 1987. Cultivo "in vitro" en remolacha azucarera, *Beta vulgaris* L. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra.
- Daguin, F. et R. Letouzé, 1985. Relations entre hypolignification et état vitreux chez *Salix babilonica* en culture in vitro. Role de la nutrition ammoniacale. *Can J. Bot.*, 63: 324-326.
- Daguin, F. and R. Letouzé, 1986. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. *Physiol. Plant.*, 66: 94-98.
- Debergh, P.C., 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.*, 59: 270-276.
- Debergh, P.C.; Harbaoui and R. Lemeur, 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.*, 53: 181-187

- Huang, L.C. and T. Murashige, 1976. Plant tissue culture media major constituents, their preparation and some applications. TCA Manual, 3: 539-548.
- Keimer, B., 1985. In vitro vegetative multiplication of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Hereditas Suppl., 3: 145.
- Kevers, C.; M. Coumans; M.F. Coumans-Gilles and Th. Gaspar, 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. Physiol. Plant., 61: 69-74.
- Miedema, P., 1982. A tissue culture technique for vegetative propagation and low temperature preservation of *Beta vulgaris*. Euphytica, 31: 635-643.
- Miedema, P., 1984. The effects of growth regulators on vitrification in shoot cultures of *Beta vulgaris*. Acta Bot. Neerl., 33: 375.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Norusis, M.J., 1986. Statistical package for the social sciences / PC+. SPSS Inc. Chicago, Illinois.
- Pasqualetto, P.L.; R.H. Zimmerman and I. Fordham, 1986. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of "Gala" apple in vitro. J. Am. Soc. Hort. Sci., 111: 976-980.
- Ranalli, P.; S. Borgatti e C. Vender, 1983. La moltiplicazione vegetativa "in vitro" della barbabietola da zucchero. Sementi Elette, 6: 7-14.
- Vieitez, A.M.; A. Ballester; M.L. Vieitez and E. Vieitez, 1983. In vitro plantlet regeneration of mature chestnut. J. Hort. Sci., 58: 457-463.
- Vieitez, A.M.; A. Ballester; M.C. San-José and E. Vieitez, 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. Physiol. Plant., 65: 177-184.
- Vieth, J.; C. Morisset et M. Lamand, 1983. Histologie de plantes vitreuses de *Pyrus malus* cv. M26 et de *Pelargonium petatum* cv. Chester Frank, issues de la culture in vitro. Rev. Can. Biol. Exp., 42: 1473-1475.
- Waller, R.A. and D.B. Duncan, 1969. A Bayes rule for the symmetric multiple comparisons problem. J. Amer. Statist. Ass., 64: 1484-1503.