

Efecto de diferentes reguladores de crecimiento en la inducción de brotes múltiples y enraizamiento de *Atropa baetica*

Rafael Zárate, Manuel Cantos y Antonio Troncoso

CSIC, IRNAS Sevilla, Apdo. 1052, 41080 Sevilla.

Resumen

Se estudió el efecto de distintos reguladores de crecimiento en la inducción de brotes adventicios y el enraizamiento de *A. baetica* empleándose yemas axilares. Las yemas axilares se cultivaron en medios de cultivo para la inducción y multiplicación de brotes, compuestos de las sales de Murashige y Skoog con 3% de sacarosa, y 0,75 o 1,25 mg l⁻¹ de BAP produjeron los resultados más óptimos, 5,6 brotes por explanto después de 31 d. Se obtuvieron resultados similares con medios suplementados con mayores cantidades de BAP (1,75 y 2,0 mg l⁻¹); sin embargo estos medios mostraron un efecto negativo en el posterior enraizamiento debido a un efecto residual de la BAP. El número más bajo de brotes se obtuvo en el medio con menor cantidad de BAP (0,25 mg l⁻¹). El enraizamiento ocurrió espontáneamente al transferir las plántulas a medio MS sin auxinas. Asimismo, la inducción de raíces ocurrió en medios MS con 0,125 y 0,250 mg l⁻¹ de ANA, que produjeron una respuesta más prominente y con mayor número de raíces. No obstante en estadios más avanzados del cultivo, la inducción de raíces fue similar en los tres medios usados. La aclimatación de las plántulas enraizadas fue elevada (95.52%); sin embargo todas las plántulas que perecieron durante esta fase habían sido previamente enraizadas en el medio conteniendo 0,250 mg l⁻¹ de ANA, sugiriéndose un efecto negativo de este medio, independientemente del tratamiento con BAP inicial. Por otro lado, los estudios cariológicos llevados a cabo con ápices de raíces de las plántulas producidas, no mostraron variación en el número de cromosomas (2n = 72).

Effect of different growth regulators on the induction of multiple shoots and rooting of *Atropa baetica*

Summary

The effect of the addition of different plant growth regulators upon the induction of adventitious shoot and rooting of *Atropa baetica* was studied using axillary buds. Single buds were cultured on multiple shoot induction media, consisting of Murashige and Skoog salts with 3% sucrose, supplemented with either 0.75 or 1.25 mg l⁻¹ of BAP which provided the best results with an average of 5.6 shoots per explant after 31 d. of culture. Similar results were obtained with higher BAP concentrations (1.75-2.0 mg l⁻¹); however, these media had a negative effect on the subsequent root induction due to residual BAP effect. Medium containing only 0.25 mg l⁻¹ of BAP induced a significantly lower number of shoots. Root induction occurred spontaneously after transferring the shoots onto MS medium lacking any plant growth regulator. Moreover, root induction also occurred on media supplemented with 0.125 and 0.250 mg l⁻¹ of NAA, giving a more prominent response and with a higher number of roots per explant. Nevertheless, at late stages of the root induction phase, the number of rooted plantlets was similar on the three media. Acclimatization of plantlets in soil was very successful (95.52%). However, all plantlets which died during acclimatization were rooted on medium containing 0.250 mg l⁻¹ NAA suggesting a negative carry over effect of this medium upon plantlet survival, irrespective of the initial BAP treatment used. On the other hand, karyological studies showed no variation in the number of chromosome (2n = 72) in root tips of the plantlets produced.

Introducción

Atropa baetica Wilk es una planta herbácea perenne de la familia Solanaceae. Presenta tallos de 80-120 cm y hojas pecioladas alternas, con flores amarillas y frutos en bayas de color negro. Esta especie es endémica del sur de España y norte de Marruecos. Se han publicado aspectos de su biología y ecología (Herrera 1987), también estudios de la germinación de semillas y desarrollo de plántulas (Aparicio 1993), y su caracterización cromosómica (Silvestre 1986). Sin embargo, su población ha disminuido marcadamente y ha sido clasificada como especie en peligro de extinción (Hernández-Bermejo y Clemente-Muñoz 1994).

La técnica del cultivo *in vitro* se ha empleado en muchos casos por ejemplo, para la erradicación de virus (Drew *et al.* 1992, Cantos *et al.* 1993), para la regeneración de especies leñosas de difícil propagación, o de especies que no producen semillas (Malamug *et al.* 1991 y Vieitez *et al.* 1994), para el establecimiento de protocolos rápidos y efectivos de micropropagación (Green y Rhodes 1982, Morte *et al.* 1992). Recientemente, se ha conferido mayor atención a las técnicas de cultivo *in vitro* para la preservación de especies amenazadas (Bramwell 1990 y Fay 1992). La mayor parte de la investigación del cultivo *in vitro* llevada a cabo con *Atropa* y los géneros afines *Hyoscyamus* y *Datura*, ha sido enfocada para el establecimiento de cultivos de protoplastos, de células, tejidos o raíces en cabellera, para el estudio de la producción de alcaloides tropánicos (Kato *et al.* 1989, Sharp y Doran 1990, Christen *et al.* 1992, Hilton y Rhodes 1993), existiendo también literatura en la propagación de *A. belladonna* (Benjamin *et al.* 1987, Bajaj y Simola 1991).

La disponibilidad de semillas para asegurar la supervivencia de *A. baetica* es muy limitada; además la germinación es baja, lo que denota las limitaciones de este proceso para mantener esta especie. Por lo tanto, la presente investigación estudió el efecto de diferentes reguladores de crecimiento (BAP, NAA) en el establecimiento de un protocolo de propagación para esta especie amenazada.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se emplearon yemas axilares de *A. baetica* derivadas de plántulas germinadas. Las semillas se esterilizaron en etanol 70% (30 s.), seguido de inmersión en 20% (v/v) de una solución acuosa de NaOCl durante 15 min. y finalmente tres lavados con agua destilada esterilizada. Las semillas se germinaron en un medio de Murashige y Skoog (1962) (MS), con 3% sacarosa, y 0.7% agar, con el pH ajustado a 5.8 antes de autoclavar a 121°C durante 20 min. a una presión de 15 psi.

Medios y condiciones de cultivo

La inducción, multiplicación y crecimiento de yemas adventicias de *A. baetica* se obtuvo a partir de yemas axilares en cinco medios de cultivo diferentes, compuestos de las sales minerales y vitaminas de MS, suplementados con cinco concentraciones de BAP, medio AS/1 (0,25 mg l⁻¹), AS/2 (0,75 mg l⁻¹), AS/3 (1,25 mg l⁻¹), AS/4 (1,75 mg l⁻¹), AS/5 (2,0 mg l⁻¹), ajustando el pH a 5,8 antes de la adición del agar y antes de autoclavar.

Cuarenta y ocho explantes de ca. 1,0 cm de longitud se inocularon en 8 ml de cada medio de cultivo contenido en tubos de ensayo (150 x 25 mm). Los tubos se colocaron en una cámara de cultivo a 25 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz / 8 h. oscuridad. La intensidad de luz fue de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Para la inducción de raíces y posterior crecimiento, se tomaron 48 brotes propagados en los cinco medios inicialmente utilizados (AS/1-AS/5) de ca. 1-1,5 cm de longitud, que se inocularon en tres medios de enraizamiento R/1, R/2 y R/3. La composición de estos medios fue la misma que los anteriormente descritos pero sustituyendo la BAP por tres concentraciones diferentes de ANA, 0,0, 0,125, 0,250 mg l⁻¹ respectivamente, ajustándose el pH como ya se ha descrito.

Para la fase de aclimatación a suelo se tomaron 48 plántulas enraizadas (ca. 10 cm de longitud) que se cultivaron, después de eliminar los restos de agar de sus raíces, en vasos de pvc conteniendo turba

comercial. El sustrato se regó a saturación y luego las plantas y vasos fueron cubiertos con bolsas plásticas transparentes en las que se pulverizó agua para así conseguir una atmósfera saturada de humedad, para prevenir la posible desecación de las plántulas. Los vasos con las plántulas se colocaron en una cámara de cultivo a 28 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h. luz / 8 h. oscuridad e intensidad de luminancia de $14,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las bolsas plásticas se abrieron gradualmente cortando uno de sus extremos después de 7, 9 y 14 días; finalmente las plantas se trasladaron al invernadero.

Examen cariológico

Se examinaron segmentos de raíces de plántulas de *A. baetica* producidas *in vitro* en los distintos medios de cultivo. Para ello, se sumergieron en una solución antimitótica de $2 \mu\text{M}$ 8-hidroxiquinoleína durante 3-4 h., seguido de inmersión en una mezcla de 1:3 (v/v) ácido acético-etanol durante un mínimo de 24 h. Las muestras se tiñeron con una mezcla de carmina-ácido clorhídrico en etanol por 24 h. a temperatura ambiente (Snow 1963). Cada punta de raíz se montó en un porta con 45% ácido acético, observándose bajo un microscopio de contraste de fases.

Resultados

Inducción y desarrollo de brotes

La inducción de brotes adventicios se estudió en los cinco medios de cultivo AS/1-AS/5 conteniendo BAP ($0,25$ - $2,0 \text{ mg l}^{-1}$). Después de 17 d. en cultivo el número de brotes formados fue similar en todos los medios de cultivo (ca. 2,0) (Fig. 1). Tras 24 d. en cultivo se observó un número mayor, con un máximo de 3.4 yemas en el medio AS/5 que presentaba el régimen más alto de BAP. Sin embargo, solo se observó diferencia estadística entre el número de yemas del medio AS/1 y AS/5 ($P 0,5$), y entre AS/1 y AS/4 al nivel del 0,1. Además el tamaño y el aspecto de los brotes formados en cada medio no mostraron diferencias.

Análogamente, el número de brotes múltiples producidos después de 31 d. en cultivo mostró una tendencia similar (Fig. 1), con la multiplicación de yemas más baja en explantos producidos en el medio AS/1, y la formación de brotes más elevada en los otros cuatro medios (5,8 brotes por explanto). Existieron diferencias significativas entre el número de brotes múltiples originados en AS/1 y en los otros cuatro medios (AS/2-5). ($P 0,5$), aunque no hubo diferencia estadística entre estos cuatro medios. Además la morfología de los brotes no difirió entre los tratamientos en este punto del cultivo. Se observó que en el transcurso de estos cultivos el número de brotes múltiples se incrementó con el tiempo siguiendo una relación lineal ($Y=0,238 X - 2,22$), con un coeficiente de correlación del 0,935, independientemente de los tratamientos con BAP utilizados (Fig.1).

Inducción de raíces y crecimiento

Para la inducción de raíces y crecimiento de plántulas se aislaron plántulas producidas en los medios de cultivo AS/1-AS/5 y se situaron en tres medios diferente de enraizamiento (R/1-R/3). Se observó la inducción de raíces de forma espontánea en el medio R/1 (no contenía auxinas), independientemente del medio con BAP utilizado. Sin embargo, esta inducción espontánea de raíces, fue inicialmente menor con aquellas plántulas que se expusieron a los regímenes más altos de citoquinina, especialmente AS/4 y AS/5 (Tabla 1).

El enraizamiento de plántulas de *A. baetica* fue mayor en R/2, que contenía $0,125 \text{ mg l}^{-1}$ de ANA, comparado con R/1 sin auxinas, o R/3 conteniendo la mayor concentración de ANA ($0,250 \text{ mg l}^{-1}$). Esta tendencia se mantuvo durante todo el período de experimentación, aunque en algunos casos no se observó diferencia estadística (Tabla 1). Además el enraizamiento en los medios que contenían auxina (R/2-R/3) fue más prominente y con un número mayor de raíces, también sólo en las plántulas enraizadas en R/3 apareció callo en la base en contacto con el medio nutritivo.

Durante la fase de enraizamiento también se observó que el tamaño de las plántulas era menor en aquellas que provenían de los medios AS/4 y AS/5 (mayores niveles de BAP), estos también siguieron

produciendo la inducción de yemas en estos medios de enraizamiento incluso después de 8-16 d.

La aclimatación de las plántulas a suelo fue positiva presentándose un alto nivel de supervivencia (95,52%). Sin embargo, se debe resaltar que aquellas plántulas que no sobrevivieron fueron enraizadas en el medio R/3 independientemente del medio inicial de inducción de yemas utilizado, exhibiendo un 21,87% de pérdidas, lo que sugiere la aparición de un efecto negativo de los niveles más altos de ANA.

Examen cariológico

El examen cariológico de las puntas de raíces se llevó a cabo para determinar si las plántulas producidas *in vitro* mostraron estabilidad en el número de cromosomas. Se conoce que *A. baetica* es diploide y posee $2n = 72$ (Silvestre 1986), el conteo de cromosomas en todas las muestras no presentó alteración en el número cromosómico, confirmando su diploidía, lo que verifica que no la propagación *in vitro* descrita de esta especie no varía su ploidía.

Discusión

El número de yemas múltiples formado después de 17 d. en cultivo fue similar para todos los tratamientos con BAP, lo que sugiere que durante este período el aumento en las cantidades de BAP no tuvo efecto en la multiplicación lo que parece indicar que un período más largo se requería para iniciarse una respuesta diferencial paralela al incremento en BAP. Sin embargo, tras 24 d. el efecto del BAP en la formación y desarrollo de yemas fue más marcado cuando las concentraciones de este regulador fueron mayores que $0,25 \text{ mg l}^{-1}$, lo que resultó en un número mayor de brotes, aunque un aumento lineal no se observó en el rango de concentraciones $0,75\text{-}2,0 \text{ mg l}^{-1}$ puesto que no hubo diferencia en el número de yemas inducidas. Además tras 31 d. se observó una respuesta similar a la registrada después de 24 d., aunque si hubo un claro aumento del número de brotes con el tiempo (Fig. 1).

Por lo tanto, se puede ver que el incremento en BAP de $0,75$ a $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ no resultó en un número mayor de brotes. Estos resultados indican la existencia de una cantidad crítica de BAP de *ca.* $0,75 \text{ mg l}^{-1}$ que provoca la respuesta más alta en la formación de brotes de *A. baetica*. Además concentraciones mayores de BAP no presentaron ningún efecto positivo o negativo en la inducción y multiplicación de brotes, así puede argumentarse que este tejido parece mostrar una sensibilidad a este regulador de crecimiento (Trewavas 1981, 1992; Firm 1986), la cual no puede ser incrementada mediante el aumento de este regulador por encima de $0,75 \text{ mg l}^{-1}$. Sin embargo, un número mayor de brotes se hubiera formado si los explantos se hubieran expuesto por un período más largo a la BAP de acuerdo con su relación lineal con el tiempo.

La inducción de raíces se observó tanto en medios con auxina como en medio sin auxina (Tabla 1) que es consistente con Flick *et al.* (1983) quien observó el enraizamiento de especies de *Datura* en medio libre de auxinas. Sin embargo, el enraizamiento espontáneo observado fue menor en aquellas plántulas originadas en AS/4 y AS/5, lo que podría ser un efecto residual de la BAP que aparece como inhibitorio, aunque este desapareció después de 12 d. (Tabla 1). También los brotes originados en estos dos medios mostraron la inducción posterior de brotes incluso después de 8-16 d. en los medios de enraizamiento aunque posteriormente esta inducción desapareció. Por lo tanto parece que un efecto persistente del BAP es manifiesto en los tejidos hasta 16 d. después de su eliminación o transferencia a medio de enraizamiento.

Por lo tanto en vista de estos resultados puede concluirse que la inducción óptima de brotes de *A. baetica* se consigue tanto en el medio AS/2 como AS/3. Además para su enraizamiento los medios R/1-R/3 dieron resultados similares, aunque R/3 fue descartado por la alta pérdida de plántulas durante la fase de aclimatación que fueron previamente enraizadas en este medio. Asimismo se determinó que no hubo variación en el número de cromosomas después de estos tratamientos, por lo que este protocolo puede emplearse para la multiplicación y conservación de esta valiosa especie.

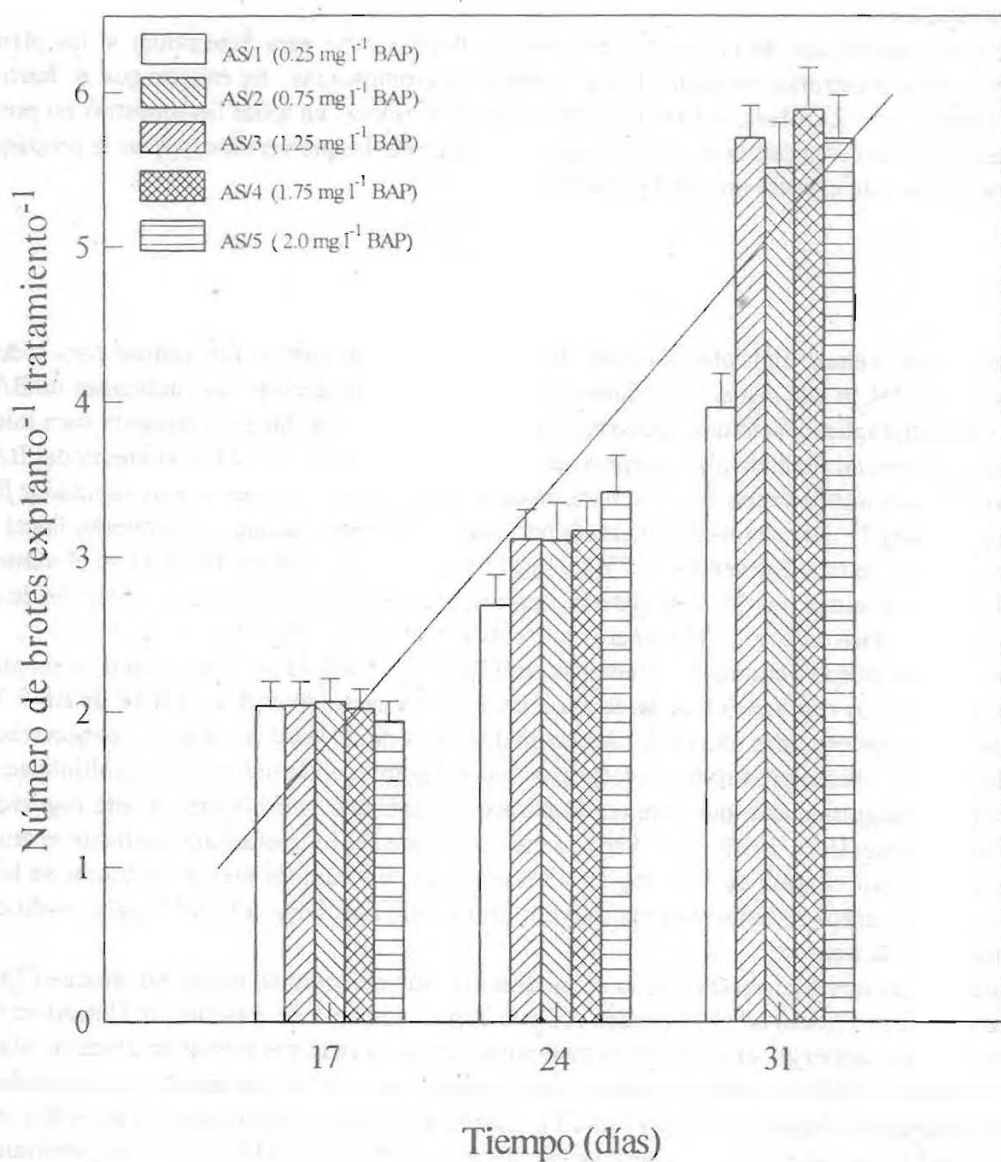


Fig. 1 Inducción de brotes múltiples de *A. baetica* empleándose yemas axilares. Las barras representan los errores estándar de las medias de 48 explantes inoculados en cada medio de cultivo. Ecuación de regresión lineal $Y = 0.238 X - 2.22$, coeficiente de correlación 0.935.

Tabla 1 Porcentaje de enraizamiento de plántulas de *A. baetica* originadas en AS/1 AS/5 (medios para la inducción de brotes múltiples), tras 8, 12, 16 y 28 d. en cultivo en los medios de enraizamiento R/1, R/2 y R/3 (número de plántulas cultivados en cada medio = 24).

Medio inicial	Porcentaje de enraizamiento (%)											
	8 d. en medio de enraizamiento			12 d. en medio de enraizamiento			16 d. en medio de enraizamiento			28 d. en medio de enraizamiento		
	R/1	R/2	R/3	R/1	R/2	R/3	R/1	R/2	R/3	R/1	R/2	R/3
AS/1	37.50 ^{a*}	79.16 ^{a b*}	33.33 ^{a*}	70.83 ^{a*}	95.83 ^{a*}	79.16 ^{a*}	70.83 ^a	95.83 ^{a*}	79.16 ^{a*}	79.16 ^{a*}	100.0 ^{a*}	75.00 ^{a*}
AS/2	16.66 ^{a*}	50.00 ^{a b}	37.50 ^{a b*}	50.00 ^{a**}	95.83 ^{a b}	45.83 ^{a*}	54.16 ^a	95.83 ^{a b*}	62.50 ^{a b*}	79.16 ^{a*}	95.83 ^{a*}	66.66 ^{a*}
AS/3	12.50 ^{b**}	45.83 ^{a b}	37.50 ^{a b*}	41.66 ^{a*}	79.16 ^{a b*}	50.00 ^{a b*}	54.16 ^a	79.16 ^{a*}	66.66 ^{a*}	70.83 ^{a*}	87.50 ^{a*}	83.33 ^{a*}
AS/4	4.16 ^{b**}	20.83 ^{b b}	12.50 ^{a b*}	37.50 ^{a*}	70.80 ^{a*}	70.80 ^{a*}	50.00 ^a	79.16 ^{a*}	79.16 ^{a*}	50.00 ^{a*}	87.50 ^{a b*}	91.66 ^{a b*}
AS/5	4.16 ^{b**}	29.16 ^{b b}	25.00 ^{a b}	41.60 ^{a*}	70.83 ^{a*}	62.50 ^{a*}	62.50 ^a	75.00 ^{a*}	66.66 ^{a*}	79.16 ^{a*}	87.50 ^{a b*}	70.83 ^{a b*}

Los valores en cada fila o columna no seguidos de la misma letra (minúscula = filas, mayúsculas = columnas) difieren significativamente (P 0.05) o (P 0.1=*) mediante 2 análisis (d.f. 1).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. A. Aparicio su ayuda en el examen cariológico. Este proyecto número AMB94-1372 fue financiado por el M.E.C. (C.I.C.Y.C.).

Bibliografía

- Aparicio A. 1993. Planes de recuperación de especies vegetales amenazadas en el parque natural de la sierra de Grazalema (Cádiz-Málaga). *Acta Bot. Malacitana*, 18, 199-221.
- Bajaj Y.P.S. & Simola L.K. 1991. *Atropa belladonna* L.: In vitro culture, regeneration of plants, cryopreservation, and the production of tropane alkaloid. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 15. Medicinal and aromatic plants III*, pp. 1-23. Springer-Verlag, Berlin.
- Benjamin B.D., Roja G., Heble M.R. & Chadha M.S. 1987. Multiple shoot cultures of *Atropa belladonna*: effect of physico-chemical factors on growth and alkaloid formation. *J Plant Physiol* 129: 129-135.
- Bramwell D. 1990. The rôle of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. In: J.E. Hernandez Bermudez, M. Clemente & V. Heywood (Eds.), *Proceedings of the Intl. Conference on Conservation techniques in botanic gardens*, pp. 3-15, Cordoba, Spain. Koenigstein: Koeltz Scientific Books.
- Cantos M., Liñan J., Pérez-Camacho F. & Troncoso A. 1993. Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de la virosis entrenudo corto. In: II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas, vol. 1. pp. 705-709, Zaragoza, Spain.
- Christen P., Aoki K. & Shimomura K. 1992. Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *A4. Plant Cell Rep* 11: 597-600.
- Drew R.A., Smith M.K. & Anderson D.W. 1992. Field evaluation of micropropagated bananas derived from plants containing Banana Bunchy-Top Virus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 28: 203-205.
- Fay M.F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *J In vitro Cellular Develop. Biology-Plant* 28: 1-4.
- Firm R.D. 1986. Growth substance sensitivity: The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. *Physiol Plant* 67: 267-272.
- Flick C.E., Evans D.A. & Sharp W.R. 1983. Organogenesis. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada (Eds.) *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1*, pp.13-81. Macmillan Publishing Co. New York.
- Green C.E. & Rhodes C.A. 1982. Plant regeneration in tissue cultures of maize. In: W.F. Sheridan (Ed.), *Maize for Biological Research*, pp. 367-372, University of North Dakota Press, USA.
- Hernández-Bermejo J.C. & Clemente-Muñoz M. 1994. Protección de la Flora de Andalucía, Junta de Andalucía, C.C.M.A. and A.M.A., Spain.
- Herrera C.M. 1987. Distribución, ecología y conservación de *Atropa baetica* Willk. (Solanaceae) en la Sierra de Cazorla. *An. J. Bot. Madrid*, 43: 386-398.
- Hilton M.G. & Rhodes M.J.C. 1993. Factors affecting the growth and hyoscyamine production during batch culture of transformed roots of *Datura stramonium*. *Planta Med* 59: 340-344.
- Kato R., Kamada H. & Asashima M. 1989. Effects of high and very low magnetic fields on the growth of hairy roots of *Daucus carota* and *Atropa belladonna*. *Plant Cell Physiol* 30: 605-608.
- Malamug, J.J.K., Inden H. & Asahira T. 1991. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. *Sci Hort* 48: 89-97.
- Morte M.A., Honrubia M. & Piqueras A. 1992. Micropropagation of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Crupessaceae). *Plant Cell Tiss Org Cult* 28: 231-233.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue

- cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Sharp J. M. & Doran P.M. 1990. Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *J Biotechnol* 16: 171-186.
- Silvestre S. 1986. Números cromosómicos para la flora española, 435-496. *Lagascalia* 14(2): 273-304.
- Snow R. 1963. Alcoholic hydrochloric acid-carmin as a stain for chromosomes in squash preparations. *Stain Technol* 8: 9-13.
- Trewavas A.J. 1981. How do plant growth substances work?. *Plant Cell and Environ* 4: 203-228.
- Trewavas A.J. 1992. How do plant growth substances work? II. *Plant Cell Environ* 14: 1-12.
- Vieitez A.M., Sanchez M.C., Amomarco J.B. & Ballester A. 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 37: 287-295.