

VIERAEA	Vol. 36	73-79	Santa Cruz de Tenerife, octubre 2008	ISSN 0210-945X
---------	---------	-------	--------------------------------------	----------------

Establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Bencomia exstipulata*, planta endémica de las islas Canarias en peligro de extinción (Magnoliopsida, Rosaceae)

ZENEIDA TACORONTE, JUAN FELIPE PÉREZ-FRANCÉS¹, EMMA SUÁREZ¹ &
 FRANCISCO VALDÉS¹

¹ *Grupo de Biología Vegetal Aplicada, Departamento de Biología Vegetal
 (Fisiología Vegetal). Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna,
 C/ Astrofísico Francisco Sánchez s/n, 38206 La Laguna, Tenerife, Islas
 Canarias. España. E-mail: jfrances@ull.es.*

TACORONTE, Z., J. F. PÉREZ-FRANCÉS, E. SUÁREZ & F. VALDÉS (2008). Establishment, multiplication and *in vitro* rooting of *Bencomia exstipulata*, an endemic and endangered plant of the Canary Islands. *VIERAEA*, 36: 73-79.

ABSTRACT: *Bencomia exstipulata* is an endemic plant in danger of extinction from Tenerife and La Palma. We decided to resort to the micropropagation techniques due to the difficult that in many cases exist for sexual multiplication and by stem cutting of these plants. Axillary and apical buds were cultured in a MS (Murashige and Skoog, 1962) culture medium with 0.5 mg/l benciladenine (BA) obtained a 77% of buds development. The immersion of the basal end of the microcuttings in a 1 g/l indole butyric acid (IBA) solution and a reduction in the strength of macronutrients in the medium produced a 95.45% of vitroplants rooted. This method might be a good alternative for *Bencomia exstipulata* propagation.

Key words: *Bencomia exstipulata*, micropropagation, *in vitro* plant tissue culture

RESUMEN: *Bencomia exstipulata* es una planta endémica de las islas de Tenerife y La Palma que se encuentra en peligro de extinción. Debido a la dificultad que existe en algunos casos para la multiplicación sexual y por esquejes de estas plantas se decidió recurrir a las técnicas de micropropagación. Se sembraron *in vitro* yemas axilares y apicales, obteniéndose un 77% de yemas desarrolladas en un medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962) enriquecido con benciladenina (BA) 0.5 mg/l. La aplicación de pulsos de ácido indolbutírico (IBA) 1 g/l sobre la base de los microesquejes y la reducción de sales del medio de cultivo produjo un 95.45% de vitroplantas enraizadas. Este método podría ser una buena alternativa para la propagación de *Bencomia exstipulata*.

Palabras clave: *Bencomia exstipulata*, micropropagación, cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

INTRODUCCIÓN

Un amplio grupo de especies vegetales se encuentran en elevado peligro de extinción, contando tan solo con un número reducido de poblaciones que presentan además un escaso número de individuos. El tamaño crítico de las poblaciones y su escasa capacidad natural de crecimiento dan lugar a la necesidad de aumentar los efectivos poblacionales mediante distintas actuaciones con el fin de asegurar la supervivencia de estas especies. En muchos casos, los métodos tradicionales de propagación vegetativa (esquejes, acodos aéreos, etc.) no han mostrado una gran eficacia. La conservación *ex situ* en bancos de semillas constituye una alternativa muy utilizada. Sin embargo, en muchos casos surgen problemas de propagación o conservación que impiden o dificultan el uso de dicha solución.

En las islas Canarias existe actualmente un número muy elevado de flora amenazada y en peligro de extinción, siendo uno de los principales motivos de esta situación la alteración de sus hábitats naturales.

Esta situación hace realmente difícil adquirir un conocimiento exhaustivo de la especie así como su conservación *ex situ* en bancos de semillas. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se muestra como un método alternativo a la hora de conservar y multiplicar estas especies para ser utilizadas en programas de reintroducción, ya que no es necesario sacrificar plantas enteras sino simplemente porciones de éstas permitiendo la supervivencia del material que se encuentra en su hábitat natural.

El cultivo *in vitro* de plantas puede definirse como el cultivo de células, tejidos, órganos, embriones y plantas enteras, en condiciones asépticas, dentro de recipientes adecuados conteniendo un medio nutritivo y en un ambiente controlado (Pérez Francés, 2006). De esta forma, es posible obtener plantas genéticamente idénticas a partir de ciertas partes aisladas de la planta madre, de forma rápida y masiva. Sin embargo, este método no puede ser aplicado si las poblaciones de las que se recolecta el material presentan enfermedades que hagan imposible el aislamiento *in vitro* en ausencia de patógenos.

En el presente trabajo se estudia el comportamiento *in vitro* de *Bencomia exstipulata*, (Rosaceae), una planta endémica de las cumbres de las islas de Tenerife y La Palma, donde se encuentra en enclaves puntuales. Esta especie está incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias en la categoría «en peligro de extinción», así como en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas con la misma categoría. Por ello, desde el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente se le planteó al Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de La Laguna la posibilidad de realizar un estudio de recuperación de esta especie por técnicas de micropropagación, un sistema de propagación vegetativa que utiliza las técnicas de cultivo *in vitro* (Pérez Francés, 2006).

El protocolo seguido ha sido: esterilización, establecimiento del material *in vitro*, multiplicación y enraizamiento de los microesquejes obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestro trabajo se centró en las tres fases previas a la aclimatación de las plantas obtenidas: Fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*.

1.-Fase de Establecimiento *in vitro*

1.1-Esterilización del material vegetal. Se empleó como material de partida, ramas recolectadas de plantas adultas enviadas desde el Parque Nacional de La Caldera de Taburiente y que fueron suministradas por Ángel Palomares Martínez, Director Conservador de dicho Parque. Se llevó a cabo una selección visual de las plantas y se realizó la poda de las porciones no aptas para, a continuación, esterilizar y sembrar las ramas seleccionadas.

Como fase previa al proceso de esterilización se realizó un lavado con agua y Tween 80, durante 30 minutos, renovando el agua de forma regular. A continuación, se sometieron las ramas a un tratamiento fungicida con una solución acuosa de Cekudazim (2gr/l) cuya materia activa es Carbendazima 50% (P/P). El material permaneció 30 minutos sumergido en esta solución en agitación. A continuación se procedió a enjuagarlo con agua corriente abundante para eliminar restos del fungicida, realizándose posteriormente un lavado de cinco segundos en etanol al 70%. Tras la eliminación de este último con agua, las ramas se introdujeron en el agente esterilizante, en este caso, hipoclorito cálcico ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$). En nuestro trabajo hemos ensayado dos concentraciones de hipoclorito, 3% y 5% (P/V), dependiendo de las condiciones que presentaba el material. Para mejorar la efectividad, el hipoclorito se empleó en condiciones de vacío y en agitación continua, añadiéndose además unas gotas de Tween 80. Finalizado el proceso anterior, se procedió a eliminar la solución esterilizante mediante 3 lavados en agua destilada esterilizada. El primero de 5 minutos y los dos restantes de 10 minutos de duración.

1.2-Siembra del material. A partir de las ramas seleccionadas y esterilizadas, se procedió a la disección de los explantes destinados a la siembra *in vitro*. Estos consistieron en yemas apicales y axilares que fueron aisladas con la ayuda de pinzas y bisturís en el ambiente estéril de la cámara de flujo laminar. La técnica más importante en micropropagación es la proliferación de meristemos, tanto axilares como apicales, con el fin de obtener múltiples plantas sin la formación previa de callo (Pati et al., 2006).

1.3-Medios de cultivo. Para el establecimiento del material en condiciones *in vitro*, se ensayaron los medios basales de Murashige & Skoog (1962) (MS) y el Woody Plant Medium (WPM) de Lloyd & McCown (1981). El medio MS se ha empleado tanto al 100 como al 50% de su fuerza iónica.

1.4-Tratamientos «de choque» con 6-benciladenina. En algunos ensayos, se incubó el material en BA a concentraciones elevadas en periodos cortos. Este tipo de tratamiento se realizó después de la esterilización y consistió en dejar durante 2 horas y en agitación las yemas sumergidas en una solución con sacarosa y BA a dos concentraciones diferentes: 100 y 200 mg/l de BA.

1.5-Tratamientos para prevenir la necrosis del material durante la fase de establecimiento. En este trabajo se emplearon varias sustancias antioxidantes para prevenir la necrosis de los explantos debido a su alto contenido en fenoles. Tras el corte de los mismos, los compuestos polifenólicos son oxidados pudiendo ser luego exudados al medio de cultivo o bien permanecer en las células, provocando a corto plazo la necrosis de los tejidos y por tanto la muerte de los explantos. Las sustancias que hemos empleado para reducir la oxidación de los fenoles han sido adicionadas al medio de cultivo; polivinilpirrolidona soluble (PVP) 1g/l y una solución compuesta por ácido cítrico (1500mg/l) y ácido ascórbico (100mg/l).

2.-Fase de multiplicación

El objetivo de esta fase es obtener el mayor número de nuevas yemas axilares en el menor tiempo posible, pero evitando siempre que se produzca variación genética en el material vegetal. Por este motivo las concentraciones de hormonas que se emplearon fueron bajas, únicamente con la intención de inducir el desarrollo de los meristemas axilares preexistentes. Se empleó, como en la fase de establecimiento, BA a bajas concentraciones. Asimismo se estudió el número de yemas viables desarrolladas a partir de una única yema (tasa de multiplicación).

3.-Fase de enraizamiento

Para cualquier protocolo de micropropagación el enraizamiento satisfactorio de los microesquejes es un pre-requisito importante para facilitar su posterior aclimatación. Debido a su gran importancia económica, existen en la bibliografía numerosos trabajos basados en mejorar la eficiencia del enraizamiento en diferentes miembros de la familia Rosaceae.

Se han ensayado dos procedimientos para el enraizamiento de los microesquejes obtenidos durante la fase de multiplicación. Las diferencias entre ambos radican en el momento en el que se aplica la auxina y el tipo de sales utilizadas en el medio de cultivo.

3.1-Adición de la auxina al medio de cultivo. Cuando los microesquejes alcanzaron un tamaño adecuado, se procedió a eliminar la zona basal necrosada del tallo y se sembraron en un medio de cultivo WPM con dos concentraciones relativamente bajas de IBA (0.5 y 1 mg/l), para promover el desarrollo de raíces.

3.2-Aplicación de tratamientos de choque con auxina. En este caso se eliminó la zona necrosada de los microesquejes y se realizaron 2 cortes longitudinales al último centímetro basal del tallo. A continuación se sumergió esta zona durante 5 segundos en una solución de IBA a altas concentraciones (500 y 1000 mg/l) y los microesquejes fueron sembrados en un medio de enraizamiento. Se ensayaron dos medios de cultivo WPM, en uno de ellos los macronutrientes fueron empleados a la concentración estándar descrita por Lloyd y McCown en 1981, mientras que en el otro se emplearon a la mitad de dicha concentración. El medio de cultivo careció de reguladores de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es importante destacar que al trabajar con una especie en peligro de extinción, la disponibilidad de material de partida es muy limitada. Esto obliga a usar explantos procedentes de diferentes plantas madre, estando éstas en diferentes localizaciones, lo que implica diferencias fisiológicas, genotípicas y sanitarias, que van a incidir sobre su competencia, determinación y fisiología. Esto, a su vez, va a condicionar la habilidad del material para su establecimiento en condiciones *in vitro*, lo que explica en gran medida, la variabilidad de los resultados obtenidos. El éxito de la micropropagación, especialmente para especies difíciles y recalcitrantes, depende fundamentalmente de la calidad de los explantos y de los reguladores de crecimiento empleados en el medio de cultivo. Para las plantas leñosas, las ramas jóvenes y poco lignificadas representan los mejores explantos (Read and Yang, 1989).

En la fase de establecimiento se ensayaron diferentes concentraciones de BA (0, 0.2, 0.5, y 1 mg/l), obteniéndose el porcentaje más elevado de yemas desarrolladas (77%) en el medio MS al que se adicionaron 0.5 mg/l BA (Tabla I). La respuesta de las yemas en estas condiciones fue buena, presentando además un aspecto sano y vigoroso. Debido a que la aplicación de una combinación de auxinas y citoquininas es de mucha importancia para algunas plantas (Pierik, 1990), se decidió evaluar su eficiencia con *Bencomia extipulata*. Se realizó un nuevo ensayo añadiendo al medio además de 0.5 mg/l de BA una pequeña concentración de ANA (0.1 mg/l). Sin embargo esto no mejoró el desarrollo de las yemas y además disminuyó su porcentaje al 66.67%.

Tabla I.- Porcentaje de yemas obtenido en la fase de establecimiento *in vitro* de *Bencomia extipulata* en un medio MS con diferentes concentraciones de BA.

El porcentaje de yemas desarrolladas durante la fase de establecimiento se vio incrementado a un 83,3% mediante el empleo de un pretratamiento consistente en la aplicación durante 2 horas de un choque hormonal constituido por una solución de 100 mg/l de BA, previo a la siembra en un medio WPM enriquecido con 1 mg/l de BA. La adición de reguladores de crecimiento en soluciones forzadoras influye en la iniciación de la yema y su posterior elongación dependiendo de los reguladores empleados (Read and Yang, 1989). Estos mismos autores comprobaron en 1991 como la presencia de BA en estas soluciones incrementó el porcentaje de yemas de *Ligustrum vulgare* y *Spirea x Vanhoutte*'s desarrolladas y además promovió su crecimiento.

Concentración BA (mg/l)	Porcentaje de yemas desarrolladas
0	72%
0.2	59.5%
0.5	77%
1	20%



Fig. 1.- Vitroplantas obtenidas *in vitro*. La fotografía de la izquierda muestra el desarrollo de las yemas tras 10 días en cultivo el medio de establecimiento y la de la derecha tras 30 días en cultivo en el mismo medio.

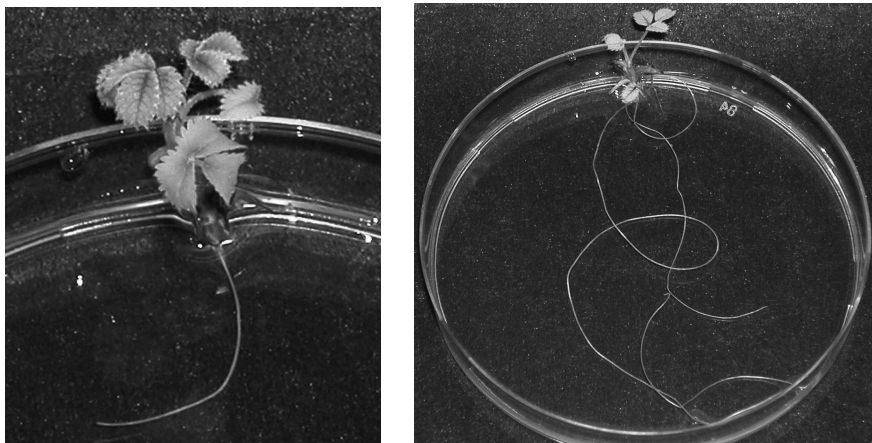


Fig. 2.- Vitroplántulas con el sistema radicular desarrollado.

La tasa de multiplicación obtenida después de dos subcultivos fue de 1,67, en un medio MS enriquecido con 2 mg/l de BA.

Se obtuvo un 95,45% de esquejes enraizados mediante la aplicación de un choque hormonal durante unos segundos con una solución de 1 gr/l de IBA, sembrando luego los explantos en un medio WPM con los macronutrientes a la mitad de su concentración ($WPM_{1/2}$). A su vez, se obtuvo una media de 3,65 raíces por planta en este mismo medio. Son muchos los trabajos con *Rosaceae* en los que una reducción en la concentración de los macronutrientes del medio (tanto MS como WPM) a la mitad, un tercio o un cuarto mejoró el enraizamiento *in vitro* de las vitroplantas (Badzian et al, 1991; Douglas et al, 1989; Sauer et al, 1985; Khosh-Khui & Sink, 1982).

El carbón activo cuando es añadido al medio de cultivo tiene una influencia importante en la eficiencia del enraizamiento de algunos cultivares de rosa (Wilson and Nayar, 1995), además de reducir los días necesarios para la aparición de las raíces. En nuestro caso fue muy importante para la iniciación y desarrollo del sistema radicular.

En conclusión este trabajo demuestra que es posible la micropropagación de *Bencomia exstipulata* a partir de yemas axilares y apicales, lo que representa una buena alternativa para la propagación de esta especie. Sin embargo, se necesitarían más investigaciones con el fin de desarrollar un protocolo adecuado para la aclimatación de las vitroplantas en condiciones naturales.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Ángel Palomares Martínez, Director Conservador del Parque Nacional de la Caldera de Taburiente, por aportarnos el material necesario para desarrollar este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- BADZIAN T, HENNEN GR, FOTYMA-KERN J. (1991). *In vitro* rooting of clonal propagated miniature rose cultivars. *Acta Hort.* 289:329-30.
- DOUGLAS GC, RUTLEDGE CB, CASEY AD, RICHARSON DHS. (1989). Micropropagation of Floribunda, ground cover miniature roses. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 19: 55-64.
- KHOSH-KHUI M AND SINK KC. (1982). Rooting enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. *Sci Hortic* 17:371-376.
- LLOYD G. AND MC.COWN B. (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant. Soc.* 30:421-427.
- MURASHIGE, T. AND SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- PATI PK, RATH SP, SHARMA M, SOOD A, AHUYA PS. (2006). *In vitro* propagation of rose-a review. *Biotechnology Adv.* 24:94-114.
- PÉREZ FRANCÉS J. F. (2006). *Cultivo In vitro de plantas y sus aplicaciones en agricultura*. Editorial: ARTE Comunicación Visual S. L. (Santa Cruz de Tenerife, ISBN: 84-96168-39-5)
- PIERIK R.L.M. (1990). *Cultivo in vitro de plantas leñosas superiores*. Ediciones Mundi-Prensa
- READ PE, YANG G. (1989). Response *in vitro* of explants chemically treated via forcing solutions. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 38:406-408.
- SAUER A, WALTHER F, PREIL W. (1985). Different suitability for *in vitro* propagation of rose cultivars. *Gartenbauwissenschaft* 50: 133-138.
- WILSON D, AND NAYAR, NK. (1995). Effect of activated charcoal on *in vitro* rooting of cultured rose shoots. *South Indian Hortic.* 43(1-2):32-4.