

Inducción de un cultivo de células en suspensión de *Sideritis cretica* (Lamiaceae)

F. VALDÉS, A. JORGE, R. MARTÍN, I. LÓPEZ, M. INFANTE &
C. MARTÍNEZ

*Departamento de Biología Vegetal (Fisiología), Universidad de La Laguna. 38271 La Laguna.
Islas Canarias*

(Aceptado el 13 de abril de 1988)

VALDÉS, F., JORGE, A., MARTÍN, R., LÓPEZ, I., INFANTE, M. & MARTÍNEZ, C., 1990. Induction of a suspension cell culture of *Sideritis cretica* (Lamiaceae). *Vieraea* 19: 3-6

ABSTRACT: A "in vitro" system of *Sideritis cretica* was induced. So different parts of the plants was tested to obtain a callus culture in a solid medium. Six months after and by a selection method, friables callus explants from petiole was taken for the obtention of a cell suspension culture.

Key words: *Sideritis cretica*, Lamiaceae, callus culture, cell suspension culture.

RESUMEN: Se indujo un sistema "in vitro" de *Sideritis cretica*. Para ello se analizaron diferentes partes de la planta, cara a la obtención de un cultivo de callos en medio sólido. Tras seis meses de selección se tomaron como explantes callos friables derivados de peciolo, para la obtención de un cultivo de células en suspensión.

Palabras clave: *Sideritis cretica*, Lamiaceae, cultivo de callos, cultivo líquido.

INTRODUCCION

Las técnicas de cultivo "in vitro" de callos (masas celulares mas o menos amorfas) y de células en suspensión (células aisladas y/o pequeños agregados celulares en medio líquido), son utilizadas no sólo como un sistema bastante elegante en investigación básica, sino también como técnicas revolucionarias en la investigación aplicada que dan pie a la Biotecnología Vegetal (STABA, 1980; VASIL, 1984).

Las células pierden la plasticidad del estado embrionario al entrar en un programa de diferenciación. Sin embargo, la mayoría de las células vegetales retienen su potencial para regresar a un estado meristemático. Mediante las técnicas de cultivo "in vitro" se puede lograr que ciertas células diferenciadas e integradas en un tejido de la planta lleguen a desdiferenciarse hasta formar masas celulares susceptibles de proliferar indefinidamente en cultivo.

En el presente trabajo se describe la puesta a punto en nuestro laboratorio de estos dos sistemas "in vitro" (cultivo de callos y de células en suspensión) para *Sideritis cretica*.

La elección de este material se ha hecho en base al interés despertado por los estudios realizados en varias especies del género *Sideritis*, donde se han aislado una amplia gama de metabolitos secundarios como diterpenos, triterpenos, esteroides, flavonoides, cumarinas, glucosidos esteroides y lignanos, la mayoría de ellos de incuestionable interés, dada la actividad biológica que presentan, (FRAGA, 1982).

MATERIAL Y METODOS

1. Material

Tallos, nudos, peciolo y hojas de plantas jóvenes de *Sideritis cretica* obtenidas a partir de semillas recolectadas en la localidad de Ayosa (2000 msn), que fueron germinadas en macetas y utilizadas como material de partida al alcanzar un tamaño medio de 35 a 40 cm.

2. Métodos.

La esterilización del material para la iniciación del cultivo se llevó a cabo en alcohol etílico al 70%, hipoclorito cálcico al 1% durante 10 minutos, y una serie de lavados en agua estéril. Para la inducción del cultivo líquido se utilizó como explante primario callos obtenidos sobre medio sólido.

La selección, escisión y siembra de los explantos se realizó al azar entre el material de diferentes ejemplares. Las condiciones de cultivo se establecieron de acuerdo con VALDES (1984), manteniéndose los mismos bajo la luz continua (3000-3600 lux) y a 25 grados Centígrados.

3. Técnicas de cultivo.

Se trabajó con un medio basal compuesto por las sales minerales propuestas por MURASHIGE y SKOOG (1962), suplementadas con sacarosa (30 g/l), tiamina (0,1 g/l), piridoxina (0,5 mg/l) y ácido nicotínico (0,5 mg/l). Esta composición de nutrientes se utilizó tanto para el medio sólido como para la experiencia en medio líquido (este sin agar). el pH se mantuvo entre 5,7 y 5,8. En los experimentos realizados se utilizaron las fitohormonas ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D); 6-Furfurilaminopurina (Quinetina) y el ácido Naftalenacético (NAA); a diferentes concentraciones. Los recipientes de cultivo fueron tubos de ensayo (36x160 mm) conteniendo 20,8 ml/tubo para las experiencias en medio sólido mientras que para el medio líquido se utilizaron erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio sin agar.

4. Cultivos en suspensión.

Para la iniciación de los cultivos en suspensión se colocaron los explantos de callos disgregables de 2-5 g. de peso fresco en 50 ml de medio y se les sometió en un agitador Kötteman a 130 rpm. Tras los primeros 10 días de cultivo inicial se filtró (ϕ de poro: 1 mm) para eliminar del medio los grandes agregados celulares y los restos del explanto inicial. El filtrado se utilizó como inóculo para mantener el sistema en suspensión, tomándose 5 ml del mismo por cada 50 ml de medio fresco. Esta operación se repitió cada 20 días aproximadamente (fig. 1).

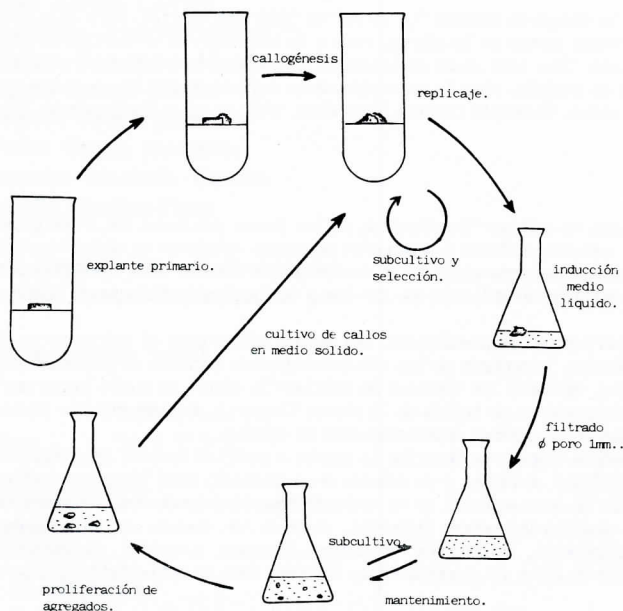


Figura 1.: Mecánica de cultivo seguida.

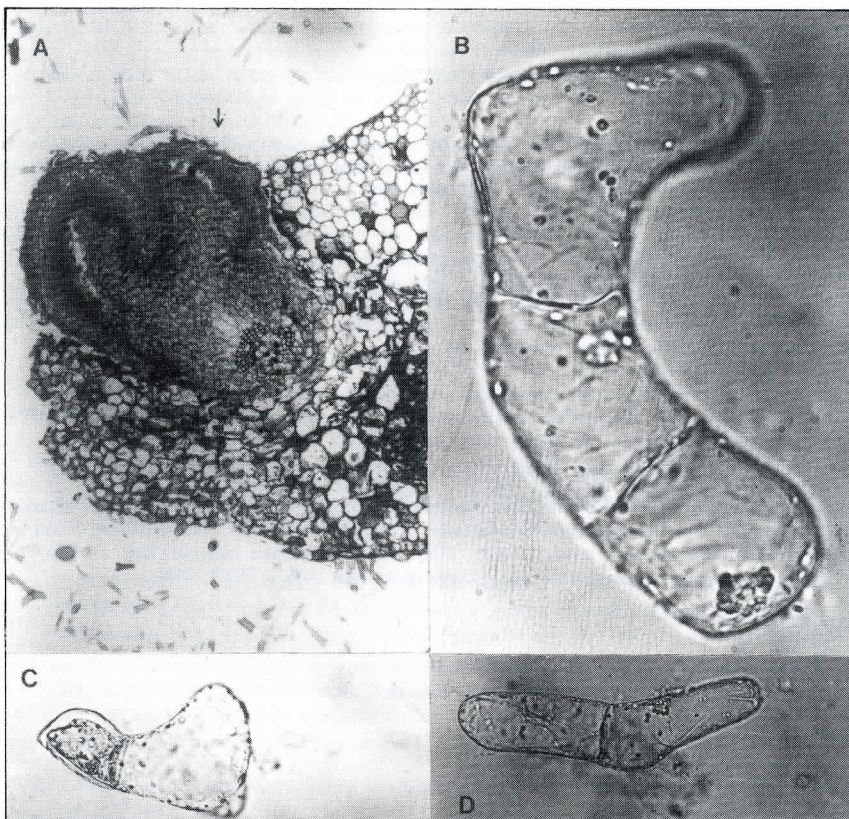


Figura 2.: (A) Formación del callo a partir del entorno del haz vascular del peciolo.
 (B,C y D) Diferentes tipos celulares presentes en los cultivos en suspensión de *S. cretica*.
 (A,C,D x10; B x40).

RESULTADOS Y DISCUSION

Si bien se logró la obtención de callos desde los diferentes explantos utilizados, los índices de contaminación determinaron un rendimiento excesivamente modesto, salvo en el caso de los explantes de peciolo. Pensamos que esta circunstancia podría ser motivada por el hecho de que en dicha zona de la planta el indumento de recubrimiento presenta un menor espesor, permitiendo por tanto que el tratamiento de desinfección sea efectivo.

Los resultados obtenidos con el uso de NAA, solo o en combinación con quinentina, muestran una alta tasa organogénica junto a un cierto grado de callogénesis. La combinación de 2,4-D (2 mg/l) con quinentina (1 mg/l) resulta muy eficaz para la inducción de callos en nuestro material. No obstante los cultivos se mantuvieron durante seis meses, al objeto de seleccionar aquellos que presentaran una tasa de división alta, homogeneidad en textura, pigmentación, y un grado de disgregabilidad alto. El medio reportado como más eficaz para la inducción de los cultivos (2,4-D/Quinentina) transcurrido ese tiempo, no dio lugar a fenómenos de organogénesis, destacando incluso la ausencia de elementos citodiferenciales, frecuentes en cultivo de tejidos, como son las traqueidas, formadas "de novo" (FUKUDA y KOMAMINE, 1985). De ahí que se partiera de los mismos para establecer los cultivos líquidos.

En cuanto a estos cultivos, WANG y STABA (1963) demostraron, que si la cantidad de inóculo en el medio líquido es pequeña, la fase de latencia del cultivo es larga (las células aisladas se dividen a menor ritmo que los agregados), así, cuanto más grandes y numerosos son los agregados, mayor es la tasa de división. Considerando esta circunstancia y para garantizar el desarrollo inicial del cultivo de células se partió de una cantidad de inóculo adecuada al volumen del medio nutritivo. Esta resultó ser de 5 ml del filtrado de células en suspensión. Nos cercioramos de la presencia en este volumen, tanto de células aisladas como de pequeños agregados celulares, a fin de reducir al mínimo la fase de latencia, (fig.).

Las suspensiones en cada pasaje ofrecieron un aspecto más o menos opaco, con una coloración que evolucionó desde un amarillo verdoso en los primeros días, a un marrón cremoso en los últimos. Algunos agregados presentaron una coloración verde, indicando la presencia de clorofilas.

La observación microscópica reveló la existencia de una importante cantidad de células aisladas junto a pequeños agregados celulares (lámina 1). Llamaron la atención la presencia de células altamente vacuoladas, con formas y dimensiones inusuales. La aparición de células gigantes, extremadamente largas y de pequeño diámetro puede ser atribuido a poliploidia celular (BAYLISS; 1973), componentes del medio como el 2,4-D y la quinentina (STREET, 1979), o envejecimiento celular (WANG y STABA, 1963), - fenómenos por otra parte muy frecuentes en cultivos de tejidos (LIN y STABA, 1961).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de La Laguna gracias a un proyecto aprobado por la Junta de Gobierno el 20 de abril de 1988.

BIBLIOGRAFIA

- BAYLIS, M.W., 1963. Origin of Chromosome numbers variation in culture plants cells. *NATURE*, 246.: 259-530.
- FRAGA, B.M., 1982. Consideraciones Quimiotaxonómicas sobre el género *Sideritis* en las Islas Canarias.- Inst. Est. Canarios. Excmo. Cabildo Insular de Tenerife.
- FUKUDA, H., KOMAMINE, A., 1985. Cytodifferentiation in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants Vol. 2 (Ed. I.K. Vasil). pp.: 250-212. Academic Press. New York.
- LIN, M., STABA, 1961. Peppermint and Spearmint Tissue Culture. I. Formation and Submerged Culture. *Lloydia* 24: 139-145.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with tobacco Tissue - Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- STABA, E.J., 1980. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. 285 pp. CRC Press. Florida.
- STREET, H.E., 1977. Plant Tissue Culture. 641 pp. Blackwell Sci. Public London.
- VALDES, P., 1984. Crecimiento, Diferenciación y Morfogénesis en cultivos de *E. Scoparium*. Universidad de La Laguna.
- VASIL, I.K., 1984. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 1. 825 pp. Ac. Press. N.Y.
- WANG, C.J., STABA, E.J., 1963. Peppermint and Spearmint Tissue Culture: Dual-carboy Culture of Spearmint tissue. *J. Pharm. Sci.* 52: 1058-1062.