



Sección de Biología
Universidad de La Laguna

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal

**Establecimiento y multiplicación *in vitro* de
Leucospermum patersonii (Proteaceae)**

***In vitro* establishment and multiplication of
Leucospermum patersonii (Proteaceae)**

Trabajo de Fin de Grado

SARA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Tutorizado por la Dra. Emma Suárez Toste y por el Dr. Juan Felipe
Pérez Francés

Grado en Biología. Junio 2020.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
Introducción.....	3
Objetivos	5
Material y métodos	5
Material vegetal	5
Métodos	6
Resultados y discusión.....	14
Conclusiones.....	21
Conclusions	22
Bibliografía.....	24

Resumen

El género *Leucospermum* se trata de uno de los géneros más importantes de próteas sudafricanas (subfamilia Proteoideae) y, en concreto, *Leucospermum patersonii*, presenta una gran importancia económica como flor cortada. Debido a ello, en las últimas décadas, se han desarrollado numerosas investigaciones, empleado técnicas de cultivo *in vitro* con el fin de mejorar y aumentar la producción de esta especie y muchas otras no solo pertenecientes a este género sino con muchas más especies de la familia *Proteaceae*.

En este trabajo, se procedió al establecimiento *in vitro* de segmentos nodales y explantos con hoja alimentadora (feeder leaf) en un medio Murashige & Skoog 1962 (MS) suplementado con diferentes reguladores de crecimiento, para comprobar las respuestas morfogénicas que experimentan los explantos. Se llevó a cabo un protocolo de micropropagación por yemas axilares, impulsando la formación de las yemas mediante el uso de diferentes concentraciones de la citoquinina benciladenina (BA), y en algunos casos, en combinación con el ácido giberélico (GA₃).

Los mejores resultados para la formación de yemas se consiguieron al utilizar BA 0,2 mg/l junto con la siembra de los explantos mediante la hoja alimentadora.

Palabras clave: Micropropagación; yemas axilares; explanto; hoja alimentadora; citoquinina; giberelina; tasa de multiplicación.

Abstract

The *Leucospermum* genus is one of the most important genera of South African proteas (subfamily Proteoideae) and, specifically, *Leucospermum patersonii*, has great economic importance as cutflower. Due to this, in the last decades, numerous investigations have been developed, employing *in vitro* culture techniques in order to improve and increase the production of this species and many others not only belonging to this genus but with many more species of the family *Proteaceae*.

In this work, *in vitro* nodal and feeder leaf explants were established in a Murashige & Skoog 1962 (MS) medium supplemented with different growth regulators, to check the morphogenetic responses that the explants experience. An axillary bud micropropagation protocol was carried

out, promoting the formation of the buds by using different concentrations of the cytokinin benzyladenine (BA), and in some cases, in combination with gibberellic acid (GA3).

The best results for bud formation were achieved when feeder leaf explants were cultured in a medium supplemented with BA 0.2 mg/l.

Key words: Micropropagation; axillary buds; explant; feeder leaf; cytokinin; gibberellin; multiplication rate.

Introducción

Un cultivo *in vitro* de plantas se puede definir 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).

Trabajar con cultivos asépticos nos da la posibilidad de obtener individuos libres de enfermedades, convirtiéndose así en una de las mejores opciones para el intercambio del material vegetal a nivel mundial, tanto con intereses en investigación como en comercialización ya que proporciona garantías sanitarias para ello (Suárez 2015).

La micropropagación se trata de la propagación vegetativa mediante las técnicas de cultivo *in vitro*, denominándose micropropagación debido a que el tamaño de los propágulos empleados, por lo general, es mucho menor que el utilizado en la propagación vegetativa convencional. En un protocolo de micropropagación hay diferentes fases. Una fase 0 (fase preparativa), fase 1 (fase de establecimiento o iniciación *in vitro*), fase 2 (fase de multiplicación), fase 3 (fase de enraizamiento) y fase 4 (fase de endurecimiento o aclimatación y paso a tierra).

La micropropagación de los organismos vegetales puede realizarse utilizando diferentes estrategias que dependen de la naturaleza de los propágulos y de los medios de cultivo empleados. Por tanto, según esto, podemos distinguir diferentes métodos de micropropagación como pueden ser por yemas axilares, por organogénesis o por embriogénesis somática.

En el caso de la micropropagación por yemas axilares, se basa en un método que incluye diferentes técnicas en las que se busca la estimulación de meristemos axilares y apicales preexistentes a partir de los cuales se desarrollarán nuevas yemas que serán utilizadas como unidades de propagación durante el desarrollo de la fase de multiplicación. La importancia de este método de micropropagación es que muchas plantas, entre ellas, especies interesantes de la familia *Proteaceae*, se pueden micropropagar mediante este método usando explantos nodales y al optimizar los protocolos de micropropagación se puede impulsar la comercialización y exportación a nivel mundial de estas plantas (Suárez 2015).

El medio más utilizado para el cultivo *in vitro* de próteas es el medio propuesto por Murashige & Skoog en 1962 (MS) ya que se ha comprobado que la mayoría de estas plantas reaccionan favorablemente en él (Ben-Jaacov & Jacobs 1986; Kunisaki 1989, 1990; Pérez-Francés *et al.* 1995; Suárez *et al.* 2010). En concreto, se suele emplear $\frac{1}{2}$ MS, es decir, un medio MS con las sales de macronutrientes a la mitad de concentración (Kunisaki 1989, 1990; Suárez *et al.* 2010).

Sin embargo, cabe destacar que su elevado contenido salino hace que incluso se utilice $\frac{1}{4}$ de su formulación original ya que para muchas próteas puede resultar tóxico. Sin embargo, Offord *et al.* (1990, 1992) consiguieron el desarrollo de *Telopea speciosissima* con el medio MS completo, pero con el doble de la concentración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

A pesar de que el medio MS es el más empleado para el cultivo de próteas, también se han usado otros medios, como, por ejemplo, el desarrollado por Lloyd & McCown (1981) para el cultivo *in vitro* de especies leñosas, sensibles a la salinidad que ha sido empleado para el cultivo de *Protea neriifolia* (Van Staden *et al.* 1981), *Leucospermum cuneiforme* y *Leucospermum* 'Red Sunset' (Ben-Jaacov & Jacobs 1986), *Leucospermum* 'Hawaii Gold' (Kunisaki 1989), *Macadamia integrifolia* (Gitonga *et al.* 2008) y algunos genotipos del género *Grevillea* (Evenor & Reuveni 2008). Respecto a la fuente de carbono, el carbohidrato más empleado en general en los cultivos *in vitro* es la sacarosa siendo este también el más utilizado en los cultivos *in vitro* de próteas. El regulador de crecimiento que se suele emplear para la micropropagación por yemas axilares en esta familia de plantas suele ser una citoquinina, como, por ejemplo, kinetina (Ben-Jaacov & Jacobs 1986; Pérez-Francés *et al.* 1995) o benciladenina (BA) (Kunisaki 1989, 1990; Pérez-Francés *et al.* 1995; Suárez *et al.* 2010). Además, en algunos casos la combinación de benciladenina y ácido giberélico (GA_3) mejoró el desarrollo de las yemas axilares (Pérez-Francés *et al.* 1995). Por último, respecto al agente gelificante, el más empleado es el agar en concentraciones 0,6-0,8% (Ben-Jaacov & Jacobs 1986; Kunisaki 1989; Pérez-Francés *et al.* 1995; Suárez *et al.* 2010). Otro agente gelificante es el Gelrite (Phytigel), a concentraciones del 0,15- 0,25 %, que se ha utilizado para la germinación de semillas y el desarrollo de embriones somáticos en *Protea cynaroides* (Wu *et al.* 2007), para la germinación de semillas de especies del género *Leucospermum* (Croxford *et al.* 2006) y para la multiplicación de *Leucadendron* 'Safari Sunset' (Pérez-Francés *et al.* 1995; Suárez *et al.* 2010).

Por último, en los medios de cultivo se pueden adicionar sustancias antioxidantes o compuestos que retengan sustancias fenólicas para facilitar el desarrollo de los cultivos en plantas que sean ricas en compuestos polifenólicos, como las próteas. Por tanto, con las sustancias antioxidantes se puede evitar la necrosis y la muerte de los tejidos ocasionada por la oxidación de los compuestos fenólicos. Entre los tratamientos para prevenir la oxidación por compuestos fenólicos más empleados en la mayoría de los protocolos de micropropagación de próteas están la polivinilpirrolidona (Suárez *et al.* 2010), que adsorbe los compuestos fenólicos producidos por el explanto o un tratamiento antioxidante con una combinación de ácido cítrico y ácido ascórbico (Pérez-Francés *et al.* 1995; Suárez *et al.* 2010).

Las principales áreas de cultivo de esta familia de plantas descritas por Dorrington (2008) a nivel mundial son Australasia (Australia, Nueva Zelanda, Israel y China), África (Sudáfrica, Mozambique, Zambia y Zimbabue), Norteamérica y Suramérica (California, Hawái, Chile, Ecuador y Perú) y Europa (Portugal y España). En el caso de Canarias, la capacidad de adaptación de las próteas al clima y suelo de las islas hacen de este un cultivo adecuado y rentable para las zonas de medianías, por lo que, estas se han cultivado con éxito hace más 20 años. En concreto, en la isla de Tenerife, las primeras plantaciones que se realizaron en el campo fueron en 1982 (Rodríguez-Pérez 2007). Y en la actualidad, el cultivo está mucho más extendido, no solo en Tenerife sino también en las islas de La Palma y Gran Canaria, donde alrededor de 1 millón de flores por año son producidas para exportar a Europa, Estados Unidos, Japón etc. (Suárez *et al.* 2018).

Objetivos

Este trabajo tiene como principal objetivo el establecer un protocolo óptimo para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *Leucospermum patersonii* por medio de técnicas de propagación *in vitro* por el método de yemas axilares. Para ello se plantean tres objetivos específicos, que conducirán a la obtención del objetivo principal, y se mencionan a continuación:

1. Desarrollar un protocolo de esterilización eficaz para el desarrollo *in vitro* de *Leucospermum patersonii*.
2. Elaborar un protocolo para el establecimiento *in vitro*.
3. Realizar un protocolo para la multiplicación *in vitro*.

Material y métodos

Material vegetal

La planta empleada en el trabajo ha sido una especie perteneciente a la familia *Proteaceae*, en concreto, *L. patersonii*. Se trata de un arbusto o arbolito de hasta 4 m de altura, con hojas

oblongas, glabras, cordadas en la base y dentadas en el ápice. Con flores de hasta 9 cm de diámetro y el color varía de naranja a rojo (Fig. 1). La floración es en invierno-primavera (Vogts 1982). En Tenerife es de enero a abril (Rodríguez-Pérez 1993).



Figura 1. Inflorescencia de *L. patersonii*.

La familia *Proteaceae* comprende unos 82 géneros, de los cuales los más importantes por su comercialización como flor cortada son *Protea*, *Leucospermum*, *Leucadendron*, *Banksia* y *Grevillea*, incluyendo también especies de importancia en jardinería. En la actualidad, se encuentran distribuidas en los tres continentes templados del hemisferio sur (Australia, África y Sudáfrica). Cabe señalar que el género *Leucospermum* es uno de los géneros más destacados de esta familia y consta de unas 48 especies, con una distribución natural restringida principalmente a Zimbabue y El Cabo (Vogts 1982).

La familia *Proteaceae* presenta una serie de características como tener un porte de árbol o arbusto, raramente hierbas perennes. Con hojas alternas, muy coriáceas, enteras o divididas de muy diversa manera. No presentan estípulas, el periantio es corolino, tetrámero valvado y con los tépalos comúnmente doblados o enrollados al abrir. Presentan 4 estambres, opuestos a los tépalos, generalmente insertos sobre ellos. Las anteras presentan mayormente 2 lóculos paralelos de apertura longitudinal. El ovario es súpero, unilocular y el estilo es terminal y sin dividir. El fruto es en folículo leñoso o coriáceo, más o menos dehiscente, raramente una cápsula bivalva, o un aquenio o una drupa indehiscente. Las semillas suelen ser entre 1-2, a veces aladas y el embrión es recto y con los cotiledones carnosos y con una corta radícula (Hutchinson 1959).

Métodos

Esterilización

A lo largo del trabajo se aplicó un protocolo de esterilización, donde en primer lugar, se tomaron ramas jóvenes y sin flores de *L. patersonii* en crecimiento en condiciones naturales. Dicho material fue recolectado en la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería de la ULL (Fig. 2) y luego, en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la ULL, se inició el protocolo de esterilización (Fig. 3).



Figura 2. Plantas de *L. patersonii* cultivadas en la finca experimental situada en la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería de la Universidad de La Laguna.

Primero se eliminaron las hojas de los brotes y se sumergieron en agua y Tween 80 (10 gotas/l) durante una hora en continua agitación y vacío. Transcurrida la hora, se lavó el material con un fungicida de amplio espectro (Difenoconazol 1,67% p/v) durante una hora en continua agitación y vacío. Luego se hizo un enjuague con agua para eliminar el fungicida y los explantos se colocaron en etanol al 70% durante 5s y, posteriormente se lavó nuevamente con agua. A continuación, en la cámara de flujo laminar, se sumergieron los brotes en una solución de hipoclorito sódico (5% cloro activo) más unas gotas de Tween 80 (10 gotas/l) en vacío y en agitación constante durante 20 minutos, seguidos de tres lavados con agua destilada esterilizada (5 s, 15 min y 15 min). Finalmente, se realizó el corte de los segmentos multinodales, de aproximadamente 2-3 cm de longitud y su siembra en los diferentes medios de cultivo.

Una vez sembrados, los explantos se colocaron en una cámara de incubación en las siguientes condiciones:

- Temperatura: 22° C±2
- Humedad relativa: 60-70%

- Fotoperíodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad
- Irradiancia: $110 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
- Tipo de lámpara: luz blanca 6000° K (Philips TLD, 58W-84)

En los ensayos con hoja alimentadora, los segmentos multinodales se obtuvieron previamente a la esterilización.

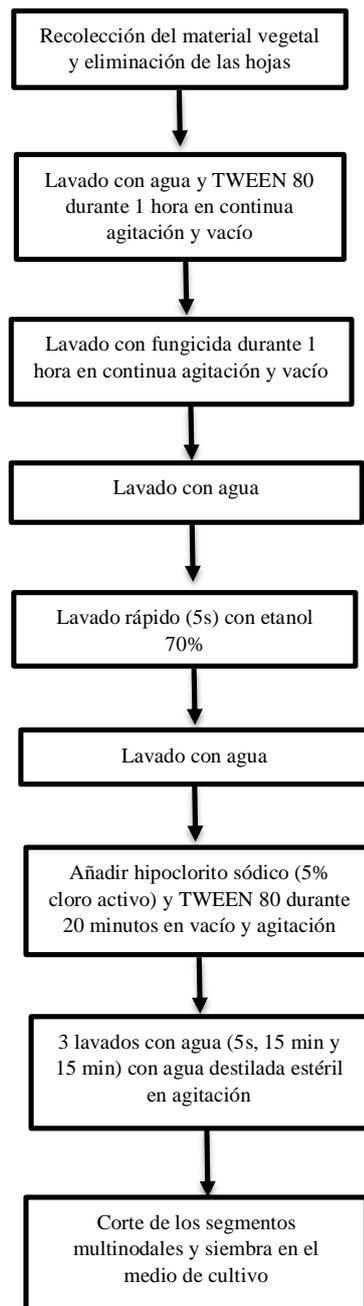


Figura 3. Diagrama de flujo del protocolo de esterilización.

Fase de establecimiento

- Sin pretratamiento

Tras haberse tomado el material vegetal y haber realizado su esterilización, se colocaron los segmentos multinodales de 3 cm de longitud con 2 o 3 nudos (Fig. 4) en un medio MS con las sales de macronutrientes a la mitad de concentración ($\frac{1}{2}$ MS), sacarosa al 2% y agar al 0,8 %. Además, al medio $\frac{1}{2}$ MS se le añadió ácido ascórbico (150 mg/l) como compuesto antioxidante. El medio se complementó con reguladores de crecimiento, en concreto, con BA (0, 0,2, 0,5 y 1 mg/l) y se ajustó el pH entre 5,9-6,3 antes de esterilizarse por autoclave durante 25 minutos y a 1 atmósfera de presión.

En cada uno de los cuatro medios, se sembraron 12 explantos y se realizaron tres repeticiones. Después de la siembra, los explantos se depositaron en la cámara de incubación y permanecieron en ella. Pasadas tres semanas, los explantos fueron subcultivados a un medio fresco, excepto en la primera repetición. Ante una alta y rápida necrosis en el material vegetal, se procedió a realizar el subcultivo a la segunda semana y antes de realizar los subcultivos, se eliminaba la parte basal necrosada de los explantos y se sumergían durante 30 minutos en una solución estéril compuesta por ácido cítrico (100 mg/l) y ácido ascórbico (150 mg/l).

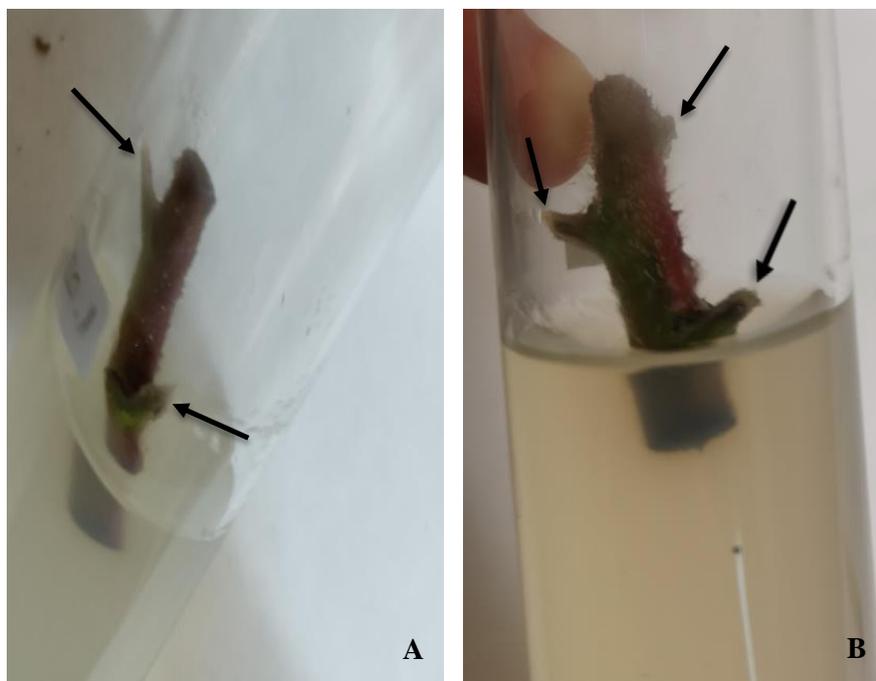


Figura 4. Explanto sembrado en el medio de cultivo. A. Explanto con dos nudos (flechas). B. Explanto con tres nudos (flechas).

- ***Pretratamiento con soluciones forzadoras***

Se recolectaron ramas de unos 7 o 8 cm de longitud de *L. patersonii* y se esterilizaron como se explicó anteriormente. Una vez esterilizadas, estas se colocaron en tubos de ensayo con 5 ml de solución forzadora compuesta por $\frac{1}{4}$ MS con 2 % sacarosa (Fig. 5).



Figura 5. Parte basal de una rama de *L. patersonii*, previamente esterilizada, sumergida en la solución forzadora.

En concreto, se emplearon tres soluciones forzadoras. Una sin reguladores de crecimiento ($\frac{1}{4}$ MS0), la segunda con BA ($\frac{1}{4}$ MS 0, 25 mg/l BA) y, la última, con BA y GA₃ ($\frac{1}{4}$ MS 25 mg/l BA+10 mg/l GA₃). De cada solución se sembraron 6 tubos de ensayo y se llevaron a cabo tres repeticiones.

Las soluciones forzadoras se esterilizaron en autoclave durante 25 minutos y a 1 atm de presión. Sin embargo, GA₃, al ser termolábil, se esterilizó por medio de filtración empleando un filtro de membrana con tamaño de poro de 20 micras (Chromafil CA-20). Posteriormente, se añadió a las soluciones esterilizadas una vez finalizado el autoclave.

Las ramas permanecieron en las soluciones forzadoras durante 10 días en la cámara de incubación. Pasado este tiempo, se cortaron segmentos nodales, de unos 2-3 cm aproximadamente y se sembraron en un medio $\frac{1}{2}$ MS en ausencia de reguladores de crecimiento. Concretamente, fueron obtenidos y sembrados 24 segmentos nodales.

- *Hoja alimentadora*

Se seleccionaron ramas de unos 9 o 10 cm de longitud de *L. patersonii*. Previamente al proceso de esterilización, se obtuvieron segmentos multinodales de aproximadamente 5 cm de longitud, a los cuales se le retiraron las hojas, manteniendo solo una de ellas para poder realizar la siembra más adelante. A continuación, se llevó a cabo la esterilización de la misma forma que en los ensayos anteriores y una vez realizada, los explantos se sembraron en un medio $\frac{1}{2}$ MS con 2% de sacarosa, 0,8 % de agar y diferentes concentraciones de BA (0, 0,2, 0,5 y 1 mg/l). En cada uno de los cuatro medios, los cuales se encontraban en botes de cristal, se sembraron 26 explantos. Asimismo, se realizaron tres repeticiones.

La siembra se realizó por medio de la hoja que se conservó en los segmentos multinodales (hoja alimentadora) (Fig. 6.A.). Se eliminó transversalmente $\frac{1}{3}$ de la hoja (Fig. 6.B.) y se introdujo en el agar, quedando el explanto suspendido sobre el medio de cultivo sin estar en contacto con él (Fig. 6.C.).

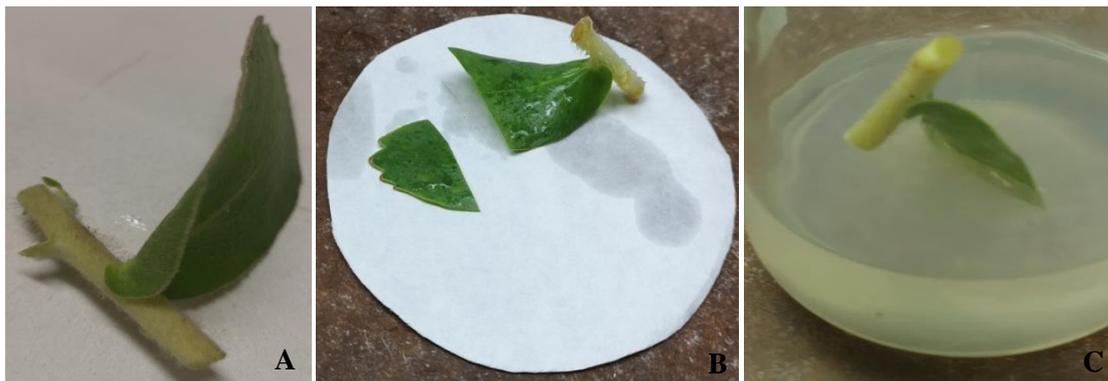


Figura 6. A. Hoja alimentadora. B. Eliminación de un $\frac{1}{3}$ de la hoja alimentadora, tras la esterilización. C. Cultivo del explanto con la hoja alimentadora quedando este elevado sin entrar en contacto con el medio.

Los explantos fueron subcultivados a las tres semanas de cultivo a un medio similar y nuevo, refrescando la hoja. Cuando estos comenzaron a desarrollar yemas, se les eliminó la hoja y se cultivaron en tubos de ensayo con el mismo medio, pero en forma vertical. Tras tres semanas de cultivo, al estar las yemas más desarrolladas, los explantos se sembraron de nuevo en botes donde se realizó un subcultivo a las cuatro semanas. Después de esa transferencia, se cultivaron en un medio de elongación con 1 mg/l GA₃ durante tres semanas.

Durante la fase de establecimiento, en los tres ensayos realizados (sin pretratamiento, pretratamiento con soluciones forzadoras y hoja alimentadora) se contabilizó semanalmente el número de explantos contaminados y la cantidad de yemas obtenidas por cada uno.

Fase de elongación

Los explantos que originaron yemas en la fase de establecimiento se sembraron durante tres semanas en un medio de elongación con 1mg/l GA₃. Esto se realizó antes de cultivarse en el medio de multiplicación con el objetivo de conseguir una mayor elongación de las yemas por medio del GA₃ y así poder optimizar el proceso de multiplicación, ya que el tamaño de las yemas puede estar relacionado directamente con su supervivencia. Esto último, es especialmente importante en próteas, ya que su alto contenido en compuestos fenólicos provoca la oxidación de los mismos y, por tanto, una rápida necrosis de los tejidos y, en especial, en los explantos más pequeños. La oxidación de los fenoles es una respuesta al daño realizado en la zona de corte de los explantos, cuando estos son muy pequeños, la proporción de la zona dañada durante el corte es grande en comparación con el tamaño total del explanto, por lo que, se necrosan rápidamente.

Fase de multiplicación

Para la obtención del mayor número de yemas axilares en el menor tiempo posible, se empleó el método de multiplicación de yemas axilares. Esta técnica consiste en la estimulación de los meristemos preexistentes en los explantos para el desarrollo de nuevas yemas. La baja concentración de reguladores de crecimiento necesaria y el empleo de material con meristemos preexistentes garantizan el mantenimiento de la estabilidad genética del sistema.

La multiplicación puede llevarse a cabo de dos maneras diferentes dependiendo del material del que se disponga. En cualquier caso, lo primero, es escindir las yemas obtenidas durante la fase de establecimiento. Si son muy pequeñas, pueden sembrarse aisladas en el medio de multiplicación, originándose con el tiempo grupos de pequeñas yemas a su alrededor, que puedan volver a escindirse, con lo que cada una de ellas dará lugar a un nuevo grupo de pequeñas yemas.

En cambio, si las yemas se han desarrollado durante la fase de establecimiento hasta formar vástagos de más de 20 mm de longitud, éstos pueden dividirse en segmentos uni o multinodales, donde a partir de cada uno de ellos se originará una nueva yema, que podrá ser escindida y dividirse a su vez en segmentos nodales, con el fin de continuar el proceso de la multiplicación (Fig. 7).

En nuestro caso, se utilizó como material de partida microesquejes de más de 20 mm, procedentes de la fase de establecimiento y posterior elongación. Estos se trocearon en segmentos multinodales, eliminando el meristemo apical para favorecer el desarrollo de las yemas axilares y se sembraron en el medio de multiplicación. El medio de multiplicación consistió en un medio ½ MS, con sacarosa al 2%, 0,8% de agar y con reguladores de crecimiento (0,5 mg/l BA + 0,01 mg/l ácido indol butírico (IBA)). En él, se sembraron 22 segmentos multinodales y se llevaron a cabo 3 subcultivos con una duración de 21 días cada uno de ellos.

En esta fase, el parámetro objeto de estudio fue la tasa de multiplicación (TM). Esta se define como el número de yemas viables obtenidas a partir de una yema al final de cada subcultivo.

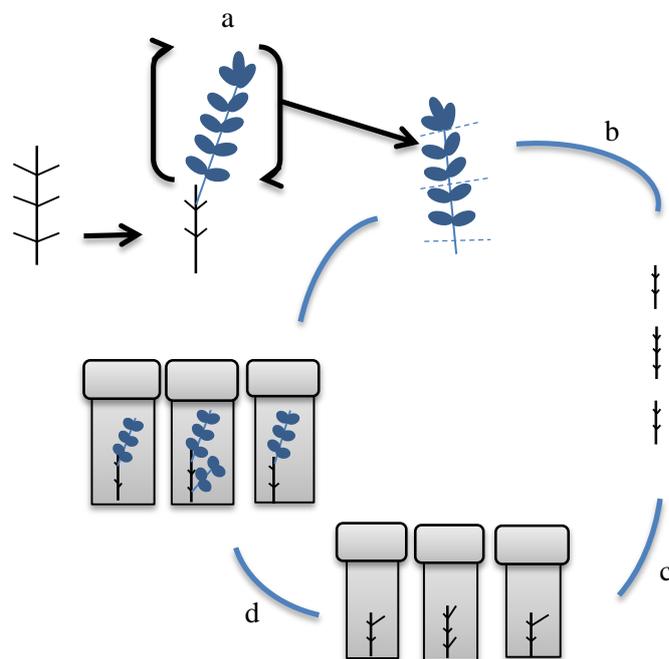


Figura 7. Esquema de los pasos seguidos para la fase de multiplicación por yemas axilares de *L. patersonii*. Las yemas axilares desarrolladas durante la fase de establecimiento *in vitro* permanecieron en el explanto inicial hasta formar vástagos de más de 20 mm de longitud (a) que se dividieron en segmentos nodales (b) y se sembraron aisladamente (c) para formar nuevos vástagos (d).

Análisis estadístico

Para el análisis de las medias del porcentaje de yemas y su longitud se utilizó el paquete estadístico SPSS 22.0 para Windows. Los datos cuantitativos se analizaron usando análisis de varianza. En los casos en los que se encontraron diferencias significativas ($\alpha= 0,05$) entre los medios empleados, se realizó el test de Duncan para contrastar las medias.

Resultados y discusión

Esterilización

En la figura 8, se muestran los porcentajes de contaminación obtenidos durante la fase de establecimiento de los cultivos para los tres ensayos (sin pretratamiento, pretratamiento con soluciones forzadoras y hoja alimentadora). Se aprecia como en el primer ensayo, la contaminación fue de 17,1%, en el caso de las soluciones forzadoras fue de 41,7 % y para el último ensayo fue de 5,7 %. Según esto, podemos apreciar una notable diferencia entre los diferentes ensayos realizados, ya que en la fase de establecimiento sin pretratamiento no se obtuvo un alto porcentaje de contaminación, pero en el caso de las soluciones forzadoras presentaron un porcentaje mucho más elevado y causado principalmente por hongos. Ese aumento de la contaminación en el segundo ensayo se debió a que algunas de las ramas, las cuales estuvieron durante 10 días en las soluciones forzadoras, podían estar contaminadas sin que fuese perceptible en el momento de la obtención de los segmentos multinodales. Por tanto, los 4-5 explantos que se sembraron a partir de esas ramas contaminadas, resultaron también contaminados, elevando así el porcentaje de contaminación en este caso. Y, por último, el menor porcentaje de contaminación obtenido fue en el caso de la hoja alimentadora.

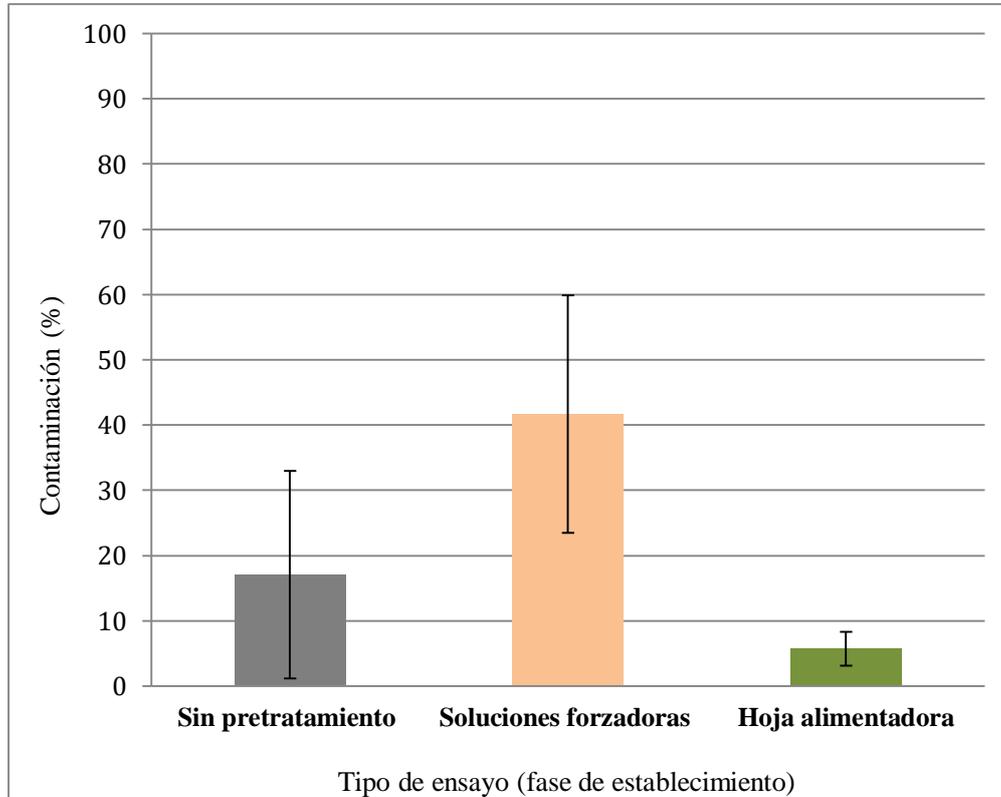


Figura 8. Porcentajes de contaminación obtenidos para los tres métodos (sin pretratamiento, soluciones forzadoras y hoja alimentadora) durante la fase de establecimiento del trabajo.

Teniendo en cuenta lo comentado previamente, aunque la contaminación sea más o menos excesiva, prácticamente siempre aparece cierta contaminación en los cultivos durante las diferentes fases de un protocolo de micropropagación. Esta puede aparecer debido a muchos factores, como, por ejemplo, la climatología. Además, otro de los factores que puede influir podría ser el estado fitosanitario de la planta madre ya que el material vegetal empleado no se encontraba en condiciones de invernadero, sino que las plantas se encontraban en una de las fincas experimentales de la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería de la ULL (Fig. 2). Aunque estas plantas son sometidas periódicamente a tratamientos fitosanitarios en campo, estos podrían no ser suficientes para solventar la contaminación o deberían de realizarse en días más cercanos a la recogida de material, para así garantizar un mejor estado de la planta madre.

En cuanto al protocolo de esterilización, se empleó hipoclorito sódico como agente esterilizante, con este conseguimos porcentajes de contaminación aceptables y la ausencia de toxicidad en los tejidos ya que se respetó el tiempo de empleo del agente y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Este agente es el más empleado para la esterilización de miembros de la familia *Proteaceae* (Ben-Jaacov & Dax 1981; Kunisaki 1989; Offord *et al.* 1990; Rugge *et al.* 1989; Rugge 1995; Seelye 1984; Seelye *et al.* 1986; Suárez 2015; Tal *et al.* 1992; Watad *et al.* 1992). Sin embargo, existe otro agente esterilizante, el hipoclorito cálcico, el cual ha sido empleado para la esterilización de *Leucadendron* ‘Safari Sunset’ (Pérez-Francés *et al.* 1995; Suárez *et al.* 2010), *Leucospermum discolor* (Pérez-Francés *et al.* 2001a) y *Leucospermum* ‘Sunrise’ (Pérez-Francés *et al.* 2001b). Ambos agentes, presentan una efectividad similar, pero el hecho de que el hipoclorito cálcico se encuentre en forma granular, obliga su preparación, conllevando a que la utilización del hipoclorito sódico se haya extendido. Incluso, este último, presenta también un almacenamiento y manipulación sencilla. Además, en algunos ensayos se emplean ambos agentes esterilizantes para observar si hubiese alguna diferencia entre ellos, sin embargo, se ha comprobado que con ambos se pueden obtener porcentajes de contaminación similares (Suárez 2015).

Aparte del hipoclorito sódico y cálcico, existen agentes esterilizantes más efectivos como, por ejemplo, el cloruro de mercurio. Aunque su peligrosidad y el alto grado de contaminación ambiental conllevan a que su utilización sea solo en casos extremos, siendo utilizado por Bunn *et al.* (2010) para la esterilización de otro miembro de la familia *Proteaceae*, *Synaphea stenoloba*.

Fase de establecimiento

- *Sin pretratamiento*

En la fase de establecimiento, sin pretratamiento, no se observó el desarrollo de yemas en ningún explanto, aunque estos contasen con 2 o 3 nudos. Algo similar ocurrió en un ensayo con *Leucospermum* ‘Tango’, donde la presencia de BA no pareció tampoco determinante para el desarrollo de yemas ya que no hubo diferencias entre los medios sin reguladores y los medios con BA (Suárez 2015). Sin embargo, en algunos casos sí se ha comprobado el efecto de dicha hormona, como, por ejemplo, en trabajos de micropropagación con *Leucadendron* ‘Safari Sunset’, en los que BA sí ha potenciado el desarrollo de las yemas (Pérez-Francés *et al.* 1995; Suárez 2015).

A parte de lo anterior, se observó una elevada necrosis de los explantos, aunque se adicionara en el medio de cultivo ácido ascórbico como sustancia antioxidante, e incluso, previamente a realizar los subcultivos se sumergieran los explantos en una solución con ácido ascórbico y ácido cítrico. Lo que se pretendía con el uso de esos compuestos antioxidantes era evitar o que fuese menor la necrosis ocasionada por la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en *L. patersonii*, pero no resultó así, en concreto, se dio un 92 % de necrosis y el medio con el mayor número de explantos necrosados fue el ½ MS con 0,2 mg/l BA (100%).

La adición de ácido ascórbico al medio y el lavado de los explantos no ocasionaron los resultados esperados. Esto podría explicarse, además de por el elevado contenido en compuestos fenólicos de esta familia, por otros factores. Uno de ellos sería la edad de los tejidos, es decir, cuanto más joven sea el material, presentará menor contenido fenólico. El otro factor es el tamaño del explanto ya independientemente del contenido en fenoles, normalmente se produce una mayor oxidación cuando los explantos son de pequeño tamaño y cuando la superficie dañada al cortar los explantos es grande en comparación con la superficie total del explanto. Por lo que, según esto, en este primer ensayo, aunque se emplearon sustancias antioxidantes, tanto la edad de los tejidos (más viejos y lignificados) y el pequeño tamaño de los explantos (3 cm de longitud) conllevaron a un alto porcentaje de necrosis (Fig. 9).



Figura 9. Explanto sembrado en el primer ensayo.

- ***Con pretratamiento con soluciones forzadoras***

En este segundo ensayo, tampoco se observó la formación de yemas. Sin embargo, en experimentos realizados con *Leucospermum cordifolium* y *Leucospermum* ‘Tango’ en los que se aplicaron pre-tratamientos con soluciones forzadoras sí hubo un aumento de los porcentajes de yemas obtenidos en todos los casos (Suárez 2015).

En cuanto a la necrosis, los explantos presentaron bastante menos necrosis (10%), aunque en este ensayo no se empleó ninguna sustancia antioxidante en el medio de cultivo. Estos mejores resultados se debieron a que el material tomado era más joven y menos lignificado que en el ensayo anterior. Además, la siembra en las soluciones forzadoras se realizó con explantos de mayor tamaño, entre 7 y 8 cm de longitud. Por tanto, el empleo de un material más joven y en explantos de mayor tamaño (Fig. 10) consiguió disminuir el contenido en fenoles de los tejidos explicando esto la menor oxidación y, por tanto, la reducción de la necrosis.



Figura 10. Explanto de 7-8 cm de *L. patersonii* sembrado en las soluciones forzadoras.

- **Hoja alimentadora**

En el ensayo con la hoja alimentadora, se consiguió el desarrollo de yemas axilares. Estas comenzaron a desarrollarse al cabo de tres semanas aproximadamente, es decir, tras realizarse el primer subcultivo. En la tabla 1 se muestra el porcentaje de explantos de *L. patersonii* que desarrollaron yemas, observándose como en el medio con 0,2 mg/l BA fue en el que más explantos hubo formación de yemas. Mientras que, en el medio con la concentración más alta de BA, se obtuvo el menor porcentaje.

BA (mg/l)	% Explantos que desarrollaron yemas
0	0 ^a
0,2	79,2± 41,5 ^c
0,5	25± 44,2 ^b
1	8,3± 28,2 ^{ab}

Tabla 1. Porcentaje de explantos que desarrollaron yemas a las tres semanas de cultivo.

En la columna los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas a $\alpha = 0,05$.

En cuanto al número medio de yemas desarrolladas en cada uno de los explantos, se consiguieron resultados similares a los comentados anteriormente respecto al porcentaje de explantos. Es decir, también la mayor cantidad de yemas axilares formadas se dio en el medio con 0,2 mg/l BA y en el medio con 1 mg/l BA fue en el que menos yemas se formaron (Tabla 2).

BA (mg/l)	Yemas desarrolladas
0	0 ^a
0,2	1,13± 0,74 ^c
0,5	0,38± 0,71 ^b
1	0,17± 0,56 ^{ab}

Tabla 2. Número medio de yemas desarrolladas en cada explanto.

En la columna los valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas a $\alpha = 0,05$.

Podemos comparar estos resultados obtenidos en nuestro trabajo para *L. patersonii* con un protocolo de micropropagación *in vitro* con *Leucospermum* cv. Red Sunset. En ese ensayo, se comprobó que crecieron también significativamente más explantos y que el mayor porcentaje de brotes se dio cuando estos contaban con la hoja alimentadora. Sin embargo, esos buenos resultados se obtuvieron, a diferencia de en nuestro trabajo, con el uso de otra citoquinina, en concreto, la kinetina y a una concentración más alta (2mg/l) (Rugge *et al.* 1989).

Por tanto, teniendo en cuenta que solo se consiguió la formación de yemas axilares en este último caso, se puede deducir que fue lo adecuado el utilizar otro órgano para la siembra y diferente al empleado en los otros dos ensayos anteriores (tallo). Ya que, la hoja, es mayor y, consecuentemente a ello, habrá más superficie de contacto con el medio de cultivo, absorbiendo, por tanto, más nutrientes y BA que en los otros dos ensayos.

Respecto a la necrosis, en este último ensayo, el porcentaje de necrosis obtenido fue el más bajo de los tres ensayos, un 3 %, ya que solo en algunas de las yemas desarrolladas, las hojas de estas adquirieron una tonalidad marrón al cabo de pocos días, indicando necrosis (Fig.11. A.). Igual que en el caso anterior no se empleó ningún compuesto antioxidante pero el tejido vegetal era muy joven y poco lignificado y los explantos cultivados presentaban mayor longitud (Fig. 11.B.).



Figura 11. A. Yema con signos de necrosis en sus hojas. B. Explanto empleado en el ensayo con hoja alimentadora.

Fase de elongación

Al cabo de tres semanas, como se muestra en la figura 12, las yemas alcanzaron un desarrollo adecuado para su aislamiento del explanto inicial y posterior siembra en el medio de multiplicación. Esto mismo, se ha visto en la mayoría de los experimentos en los que emplean GA₃ (Ben-Jaacov & Jacobs 1986; Suárez 2015) e, incluso, suelen combinar el GA₃ con BA.

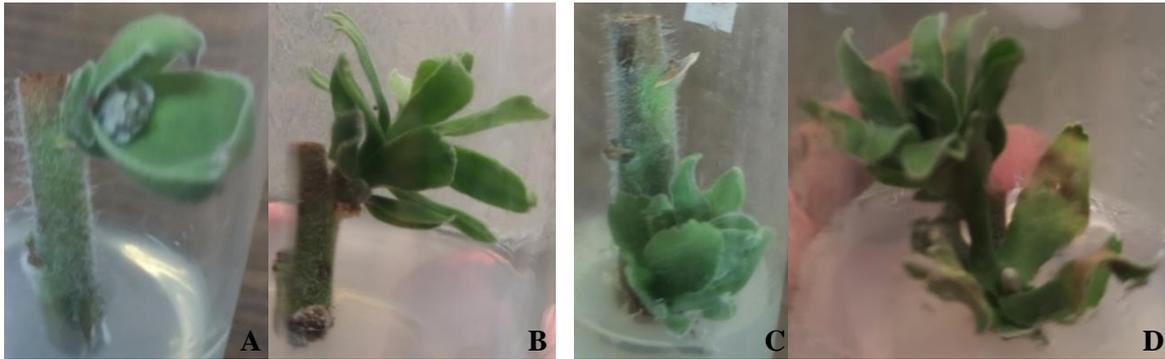


Figura 12. A. Yema obtenida en la fase de establecimiento. B. Misma yema tras tres semanas en el medio de elongación. C. Yema obtenida en la fase de establecimiento. D. Misma yema tras tres semanas en el medio de elongación.

Fase de multiplicación

- *Efecto de BA con IBA sobre la tasa de multiplicación in vitro de L. patersonii*

En general, se obtuvieron, valores bajos en las TM de las yemas de *L. patersonii*. Las tasas más bajas se obtuvieron en el primer y tercer subcultivo. Mientras que, en el segundo subcultivo, fue donde se consiguió la TM más alta (Tabla 3). A diferencia de estos valores, cabe destacar un ensayo realizado en el que se empleó un medio de cultivo similar al de nuestro trabajo y se obtuvieron valores de TM altos, dando lugar a una fase de multiplicación adecuada. En concreto, en dicho ensayo, se usó como material vegetal *Telopea speciosissima*, otra especie perteneciente a la familia *Proteaceae* y el medio contenía una combinación de IBA (0,05 mg/l) con BA (0,3 mg/l), pero, a diferencia del empleado en este trabajo para *L. patersonii*, presentaba GA₃ (2 mg/l) (Seelye *et al.* 1986).

	TM
1° Subcultivo	0,66
2° Subcultivo	0,83
3° Subcultivo	0,5

Tabla 3. Tasas de multiplicación de las yemas de *L. patersonii* durante 3 subcultivos de 21 días.

A parte de lo comentado anteriormente, anotar que, en la mayoría de los ensayos con especies pertenecientes a familia *Proteaceae* se suele usar en los medios de multiplicación BA en combinación con GA₃, obteniéndose también en algún caso resultados bajos de la TM (Suárez

2015). En otros casos, se ha empleado solo BA (en dos concentraciones) y se han obtenido algunos valores bajos de la TM de las yemas (Suárez *et al.* 2010).

Por otro lado, señalar que el IBA, se emplea con mucha más frecuencia en la fase de enraizamiento ya que se trata de una auxina. Y, por lo general, se consiguen resultados adecuados en cuanto a enraizamiento (Ben-Jaacov & Jacobs 1986; Gorst *et al.* 1978; Kunisaki 1989; Suárez *et al.* 2010).

Conclusiones:

Una vez analizados los datos y comparados con los resultados obtenidos por otros investigadores cuyos trabajos han estado dedicados a la micropropagación *in vitro* de especies de la familia *Proteaceae*, se exponen las siguientes conclusiones:

1. El método de esterilización utilizado para el material vegetal fue adecuado para la iniciación del cultivo *in vitro* de *Leucospermum patersonii* en las condiciones en las que se desarrollaban las plantas madre, obteniéndose porcentajes de contaminación aceptables. Además, este no provocó ningún tipo de daño en los tejidos.
2. La adición de ácido cítrico junto con ácido ascórbico en el medio de cultivo durante la fase de establecimiento (sin pretratamiento) no consiguió controlar la oxidación de los explantos.
3. En vista de los resultados obtenidos, la edad de la planta madre y el tamaño de los explantos parecen factores importantes para la necrosis de los tejidos en *L. patersonii*. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo son muy preliminares y debería profundizarse más sobre ello.
4. El uso de segmentos nodales como explanto tipo en los dos primeros ensayos para la micropropagación por yemas axilares, no resultó efectivo.
5. La siembra de explantos conteniendo una hoja alimentadora en contacto con el medio de cultivo permitió la formación de las yemas axilares.
6. El medio de Murashige & Skoog (1962) con sus macronutrientes a mitad de concentración ($\frac{1}{2}$ MS) fue efectivo para el desarrollo de yemas de *L. patersonii* a partir de explantos sembrados mediante la hoja alimentadora.

7. El uso de una baja concentración de BA en el medio cuando se empleó la hoja alimentadora como explanto inicial, resultó mucho más adecuado para el desarrollo de yemas que con una concentración mayor de esta hormona.
8. La adición de GA₃ en el medio de cultivo, durante la fase de elongación, provocó un mayor y adecuado desarrollo para el aislamiento de las yemas de *L. patersonii* del explanto inicial.
9. Las tasas de multiplicación obtenidas en los 3 subcultivos fueron bajas en el único medio que se empleó.

Conclusions:

After analyzing the data and comparing it with the results obtained by other researchers whose work has been devoted to the *in vitro* micropropagation of species of the *Proteaceae* family, the following conclusions are exposed:

1. The sterilization method used for the plant material was suitable for the initiation of the *in vitro* culture of *Leucospermum patersonii* under the conditions in which the mother plants were developed, obtaining acceptable contamination percentages. Furthermore, it didn't cause any type of tissue damage.
2. The addition of citric acid and ascorbic acid in the culture medium during the establishment phase (without pretreatment) failed to control the oxidation of the explants.
3. In view of the results obtained, the age of the mother plant and the size of the explants seem to be important factors for tissue necrosis in *L. patersonii*. However, the data obtained in this work are very preliminary and should be further explored.
4. The use of nodal segments as an explant type in the first two tests for micropropagation by axillary buds was not effective.
5. The culture of explants containing a feeder leaf in contact with the culture medium allowed the development of axillary buds.
6. Half strength Murashige & Skoog (1962) medium was effective for the development of *L. patersonii* buds from feeder leaf explants.

7. The use of a low concentration of BA in the medium when the feeder leaf was used as the initial explant, was much more suitable for bud development than with a higher concentration of this hormone was added to the medium.
8. The addition of GA₃ in the culture medium, during the elongation phase, caused a greater and adequate development for the isolation of *L. patersonii* buds from the initial explant.
9. The multiplication rates obtained in the 3 subcultures were low in the only medium that was used.

Bibliografía

- Ben-Jaacov, J. & Dax, E. 1981.** *In vitro* propagation of *Grevillea rosmarinifolia*. HortScience. 16(3):309-310.
- Ben-Jaacov, J. & Jacobs, G. 1986.** Establishing *Protea*, *Leucospermum* and *Serruria* *in vitro*. Acta Hortic. 185:39-52.
- Bunn, E., Stone, B. Willyams, D. & Yan, G. 2010.** *In vitro* conservation of *Synaphea stenoloba* (*Proteaceae*). Acta Hortic. 869:143-156.
- Croxford, B., Yan, G. & Sedgley, R. 2006.** Micropropagation of *Leucadendron*. Acta Hortic. 716:25-33.
- Dorrington, P. 2008.** World overview. Regional Reports given at the IPA 2008 Conference, Stellenbosch, South Africa. www.ctahr.hawaii.edu/leonhardtk/global.ppt
- Evenor, D. & Reuveni, M. 2008.** Micro-propagation of recalcitrant *Grevillea* geno-types. Acta Hortic. 805:51-55.
- Gitonga, L., Kahangi, E., Gichuki, S., Ngamau, K., Muigai, A., Njeru, E., Njogu, N. & Wepukhulu, S. 2008.** Factor influencing *in vitro* shoot regeneration of *Macadamia integrifolia*. Afr. J. Biotechnol. 7(22):4202-4207.
- Gorst, J. R., Bourne, R.A., Hardaker, S.E., Richards, A.E., Dircks, S. & de Fossard, R.A. 1978.** Tissue culture propagation of two *Grevillea* Hybrids. Comb. Proc. Int. Plant Propagators Soc. 28: 435-446.
- Hutchinson, J. 1959.** The Families of Flowering Plants. Vol. I. Dicotyledons. Clarendon Press.
- Kunisaki, J.T. 1989.** *In vitro* propagation of *Leucospermum* Hybrid 'Hawaii Gold'. HortScience. 24(4):686-687.
- Kunisaki, J.T. 1990.** Micropropagation of *Leucospermum*. Acta Hortic. 264:45-48.
- Lloyd, G. & McCown, B. 1981.** Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Comb. Proc. Int. Plant Propagators Soc. 30:421-427.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Offord, C.A., Campbell, L.C. & Mullins, M.G. 1992.** Micropropagation of *Telopea speciosissima* R. Br. (*Proteaceae*). 1: Explant establishment and proliferation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 29:215-221.
- Offord, C.A., Goodwin, P.B. & Nixon, P. 1990.** Clonal selection and micropropagation of waratah. Acta Hortic. 264:49-52.
- Pérez-Francés, J.F. 2006.** Cultivo *in vitro* de plantas y sus aplicaciones en agricultura. ARTE comunicación visual S.L. Santa Cruz de Tenerife (ISBN 84-96168-39-5).
- Pérez-Francés, J.F., Expósito, J.A. & Rodríguez, J.A. 1995.** Effect of different factor on *in vitro* multiplication of *Leucadendron* 'Safari Sunset' (*Proteaceae*). Acta Hortic. 387: 115-120.
- Pérez-Francés, J.F., Ravelo, B.J. & Rodríguez-Pérez, J.A. 2001a.** *In vitro* establishment and proliferation of axillary bud cultures of *Leucadendron discolor* (*Proteaceae*). Acta Hortic. 545:179-185.
- Pérez-Francés, J.F., Raya Ramallo, V. & Rodríguez-Pérez, J.A. 2001b.** Micropropagation of *Leucospermum* 'Sunrise' (*Proteaceae*). Acta Hortic. 545:161-169.
- Rodríguez-Pérez, J.A. 1993.** Introducción al cultivo de las próteas. Hortofruticultura, 10:35-42.
- Rodríguez-Pérez, J.A. 2007.** El cultivo de próteas sudafricanas y su desarrollo en Canarias. Publicaciones Turquesa S.L. Santa Cruz de Tenerife. Islas Canarias.
- Rugge, B.A. 1995.** Micropropagation of *Protea repens*. Acta Hortic. 387: 121-125.

- Rugge, B.A., Jacobs, G. & Theron, K.I. 1989.** Factors affecting bud sprouting in multinodal stem segments of *Leucospermum* cv. Red Sunset *in vitro*. J. Hort. Sci. 65:55-58.
- Seelye, J.F. 1984.** Propagation of the N. S. W. Warath (*Telopea speciosissima*) by tissue culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 34:403-407.
- Seelye, J.F., Butcher, S. M. & Denis, D.J. 1986.** Micropropagation of *Telopea speciosissima*. Acta Hortic. 185:281-285.
- Suárez, E. 2015.** Micropropagación de cultivares del género *Leucospermum* (*Proteaceae*). Tesis Doctoral. Sección de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de la Laguna. España.
- Suárez, E., Alfayate, C., Pérez-Francés, J.F. & Rodríguez-Pérez, J.A. 2018.** Structural and ultrastructural differences between field, micropropagated and acclimated leaves and stems of two *Leucospermum* cultivars (*Proteaceae*). Plant Cell Tissue Organ Cult. 136:15-27.
- Suárez, E., Pérez-Francés, J.F. & Rodríguez-Pérez, J.A. 2010.** Use of multinodal explants for micropropagation of *Leucadendron* ‘Safari Sunset’. Span. J. Agric. Res. 8(3):790-796.
- Tal, E., Solomon, H., Ben Jaacov, J. & Watad A.A. 1992.** Micropropagation of selected *Leucospermum cordifolium*: effect of antibiotics and GA₃. Acta Hortic. 316:55-57.
- Van Staden, J., Choveaux, N.A., Gilliland, M.G., Mc Donald, D.J. & Davey, J.E. 1981.** Tissue culture of South African *Proteaceae*. I. Callus and proteoid rootlet formation on cotyledonary explants of *Protea neriifolia*. S. Afr. J. Sci. 77:493-495.
- Vogts, M.M. 1982.** South African’s *Proteaceae*. Know them and grow them. C. Struik (Pty) Ltd. Cape Town. pp. 156-159.
- Watad, A.A., Ben-Jaacov, J., Tal, E. & Solomon, H. 1992.** *In vitro* propagation of *Grevillea* species. Acta Hortic. 316:51-53.
- Wu, H.C., du Toit, E.S. & Reinhardt, C.F. 2007.** Micrografting of *Protea cynaroides*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 89:23-28.