

Establecimiento *in vitro* de cultivos de *Lavandula dentata*

In vitro* establishment of cultures of *Lavandula dentata

Eduardo Hernández Amador
Tutorizado por Juan Felipe Pérez Francés y Emma Suárez Toste.

**Trabajo de Fin de Grado
Grado en Biología. Julio 2017**

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
1. Introducción.....	3
2. Objetivos	4
3. Material y métodos.....	4
3.1. Material vegetal.....	5
3.2. Esterilización y selección del material.....	7
3.3. Medios de cultivo.....	10
3.4. Siembra del material vegetal.....	13
4. Resultados	15
4.1. Efecto de BA sobre el establecimiento de segmentos nodales	15
4.2. Efecto de BA en combinación con auxinas sobre el establecimiento de segmentos nodales	17
4.3. Efecto de 2-4 D sobre la callogénesis en hojas de <i>Lavandula dentata</i>	20
5. Discusión	23
6. Conclusiones	25
7. Conclusions	26
8. Bibliografía	27

Resumen

Lavandula dentata se caracteriza por presentar un alto contenido en aceites vegetales de especial interés comercial. Numerosas investigaciones han tratado de emplear técnicas de cultivo *in vitro* para aumentar y mejorar la producción de esta planta. En este trabajo, partiendo de segmentos nodales y explantes de hojas se procedió a establecer cultivos *in vitro* mediante el uso de diferentes reguladores de crecimiento en los medios de cultivo con el fin de conocer cuáles ofrecen mejores resultados para esta especie. Siguiendo la metodología de la micropropagación por yemas axilares se empleó la citoquinina benciladenina (BA) sola y en combinación con las auxinas ácido indol butírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA) variando las concentraciones en ambos casos. Por otro lado, se buscó la inducción y formación de callos en explantes de hojas utilizando como regulador de crecimiento la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en diferentes concentraciones. Los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos de 2 mg/L BA (8.88 μM) en medio MS y 0,5 mg/L BA (2.22 μM) + 0,5 mg/L AIB (2.46 μM) para el establecimiento de yemas axilares. Finalmente, en el caso de la formación de callos, 2,4-D resultó un buen inductor en medios MS con una concentración de 2 mg/L (9.05 μM).

Palabras clave: *Lavandula dentata* ; cultivo *in vitro* ; segmentos nodales ; explantes de hoja

Abstract

Lavandula dentata is characterized for having a high level of vegetables oils which are known due to their great commercial interest. There have been several investigations were the techniques of *in vitro* culture have been used to increase and improve the production of the plant. In this study, nodal segments and leaf explants were established in media with different concentrations of growth regulators in order to know which show the best results for this specie. Following the axillary bud method for micropropagation, we used the cytokinin benzyladenine (BA) alone and combined with the auxins naftalen acetic acid (NAA) and indole butyric acid (IBA) changing the concentrations in all media. On the other hand, we searched for the induction and formation of callus from leaf explants using the auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in different concentrations as growth regulator. The best results were achieved with the treatments 2 mg/L BA (8.88 μ M) on medium MS and 0,5 mg/L BA (2.22 μ M) + 0,5 mg/L AIB (2.46 μ M) for the establishment of axillary buds. Finally, in the case of callus formation, the 2,4-D was a good inductor in MS media with 2 mg/L (9.05 μ M).

Key words: *Lavandula dentata*; *in vitro* culture; nodal segments; leaf explants

1. Introducción

La producción de material vegetal para su comercialización con fines ornamentales, gastronómicos, y medicinales entre otros supone, a día de hoy, el principal pilar de la agricultura moderna. La búsqueda de una optimización y mejora de los métodos de producción para obtener un producto competitivo, que cumpla con los requisitos fitosanitarios, se ha convertido en algo indispensable para la empresas dedicadas a este sector.

Una de las plantas con gran interés comercial es la lavanda, la cual ha sido objeto del estudio realizado en este trabajo, concretamente la especie conocida como *Lavandula dentata*, de la familia Lamiaceae, del género *Lavandula*.

La propagación vegetativa convencional puede traer consigo problemas en el desarrollo de la planta como resultado de las condiciones ambientales, las plagas y enfermedades que puedan afectarle debido a su distribución en la naturaleza o incluso en un invernadero, pues este no asegura del todo el buen desarrollo del material vegetal. Sin embargo, la micropropagación es un método de propagación vegetativa mediante técnicas de cultivo *in vitro* que puede reducir los problemas mencionados anteriormente al presentar una serie de ventajas, como son: la cantidad de material vegetal requerida es pequeña, se pueden obtener plantas libre de enfermedades, permite un ahorro en el gasto de energía y espacio de almacenamiento tolerando una alta producción en cualquier periodo del año bajo unas condiciones altamente controladas, y además, es un método más rápido que la propagación vegetativa convencional.

En las últimas décadas han sido varios los investigadores que han llevado a cabo experimentos relacionados con la micropropagación *in vitro* de diferentes especies de lavandas con el fin de averiguar el comportamiento de los explantes seleccionados ante determinados reguladores de crecimiento. Uno de los primeros experimentos con lavandas empleando reguladores de crecimiento fue sobre la especie *Lavandula latifolia*. Se utilizó el medio de Murashige & Skoog (1962) suplementado con 0.60 μM ácido indolacético (AIA) y 8.90 μM benciladenina (BA) para la inducción de brotes (Calvo & Segura, 1989).

Por otro lado, plantas de la especie *Lavanda stoechas* desarrolladas en condiciones naturales fueron cultivadas *in vitro* en un medio de Margara N30K (Margara, 1984) con 217.2 μM de hemisulfato de adenina (AdS) and 0.05 μM de ácido-naftalenacético (Nobre, 1996). También se han realizado tratamientos con reguladores de crecimiento sobre segmentos nodales de *Lavandula vera* utilizando medios de Murashige & Skoog (1962) suplementados con 2.25 μM tidiazurón o 2 μM benciladenina (Andrade et al., 1999), los cuales dieron lugar a plantas que se trasladaron a tierra desarrollándose sin ninguna evidencia de variación somaclonal.

Finalmente, es destacable mencionar trabajos dedicados a la influencia de reguladores de crecimiento en el desarrollo de *Lavandula dentata* y del contenido de aceites esenciales de las plantas en los que se recurrieron al uso de citoquininas y auxinas en combinación en los medios de cultivo elaborados (Jordan, Calvo, & Segura, 1998; Sudriá et al., 1999)

2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo fue:

- Emplear las técnicas de cultivo *in vitro* para desarrollar un protocolo de establecimiento para *Lavandula dentata*.

De este modo, se fijaron como objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas en la inducción y formación de yemas axilares en el material vegetal seleccionado.
- Estudiar el efecto de auxinas en la inducción y formación de callos en el material vegetal seleccionado.

3. Material y métodos

La base teórica del estudio radica en la técnicas de cultivo *in vitro* para llevar a cabo un protocolo de micropropagación. Estas técnicas implican el aislamiento y cultivo en condiciones asépticas del material vegetal seleccionado en recipientes que contienen un medio nutritivo que se almacena en espacios reservados para ello, con unas condiciones ambientales controladas que aseguran un buen desarrollo vegetal. Gracias a los descubrimientos acontecidos a lo largo de la historia en esta materia así como a la evolución tecnológica se han desarrollado diferentes métodos para la micropropagación.

En este trabajo se ha empleado el método de cultivo *in vitro* por yemas axilares a partir de segmentos nodales, y el cultivo de callos, como primer paso de la embriogénesis somática indirecta.

La micropropagación por yemas axilares consiste en la estimulación de los meristemas ya existentes en los explantes tomados como material de partida con el fin de obtener yemas axilares válidas como unidades vegetativas durante la etapa de multiplicación del método.

Por otro lado, la micropropagación por organogénesis busca la formación de nuevos meristemas gracias a su estimulación por parte de concentraciones combinadas de reguladores

de crecimiento, para dar lugar a tallos o raíces que serán empleados para obtener plantas completas.

Como último método, la micropropagación por embriogénesis somática trata de obtener embriones somáticos a través de células no sexuales o gametos que no han sido fecundados. En este trabajo se hicieron cultivos de callos para iniciar futuros trabajos sobre embriogénesis somática.

Una vez comentados los métodos de micropropagación empleados, se describe la fase en la que se centraría el trabajo, la fase de establecimiento. Esta etapa de la micropropagación consiste en la elección de los explantes adecuados, su aislamiento y esterilización, el diseño de los medios de establecimiento, la siembra del material y el almacenamiento bajo unas condiciones de cultivo óptimas. Seguidamente se procederá a comentar uno por uno estos procesos mencionados con detalle para exponer de qué manera se llevaron a cabo.

3.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado en el trabajo, procede de los invernaderos de Pérez Ortega, situados en San Cristóbal de La Laguna. En dicha empresa se adquirieron varios ejemplares de *Lavandula dentata* (Fig.1). Se caracteriza por ser una planta con propiedades medicinales, aromáticas, gastronómicas así como por su uso como elemento ornamental. Puede alcanzar el metro de altura. Presenta una capacidad adaptativa a las condiciones de sequía pues suele aparecer en suelos salinos y pedregosos de lugares soleados. Las temperaturas idóneas para su desarrollo van desde los 15°C-25°C aunque pueden resistir condiciones ambientales de hasta -7°C. Su resistencia a las plagas y enfermedades es bastante alta si es comparada con otras plantas de jardín. En cuanto a su morfología foliar, sus hojas son opuestas, lanceoladas con bordes dentados redondeados y de un color verde intenso en el haz y más blanquecino en el envés. Las dimensiones de las hojas pueden ir de 2-5 cm. Sus flores son de color violeta azulado agrupadas en largas espigas. Éstas son muy olorosas y suelen florecer desde finales de primavera hasta otoño.



Figura 1. Ejemplares de *Lavandula dentata* adquiridos para el trabajo.

La distribución de este ejemplar, se concentra en el área mediterránea de forma nativa así como en las islas de la Macaronesia. Sin embargo, hoy en día es posible encontrarla por diferentes latitudes gracias a su comercialización debido a sus diversas propiedades.

Su alto contenido en aceites como 1,8-Cineol, Fencol, Borneol y Alcanfor (Sudriá et al., 1999) le proporcionan un valor comercial de especial interés. Los aceites procedentes de la lavanda son utilizados en la industria cosmética incluyéndose en jabones, colonias, perfumes, lociones para la piel, entre otros productos (Palá-Paúl et al., 2004).

Las flores secas se suelen usar para conferir aromas a la ropa, a las casas y obtener perfumes para su comercialización. También se suele emplear en diversas recetas de cocina como en ensaladas, postres y bebidas. Cabe destacar su uso medicinal como calmante, combatiendo el insomnio, su acción cicatrizante, estimulante de la circulación sanguínea, aliviando problemas estomacales entre otros remedios.

3.2. Esterilización y selección del material

La selección del material vegetal, su esterilización y aislamiento en condiciones asépticas son fundamentales en el desarrollo de la metodología de la micropropagación *in vitro*.

Tanto el material vegetal como el material empleado durante la siembra deben cumplir unas condiciones asépticas que aseguren que el cultivo esté libre de enfermedades. Por ello deben seguirse una serie de procedimientos para la esterilización del material vegetal, del material de siembra y medios de cultivo.

La esterilización del material vegetal inicial requiere el uso de un agente químico que sea capaz de eliminar cualquier fuente de enfermedades o de contaminación que afecte al material de partida. Es importante que dicho agente no sea tóxico a las concentraciones empleadas y sea fácilmente eliminado después de enjuagues en agua destilada del material. Empleando hipoclorito de sodio además de una mejora en las condiciones de esterilización como la adición de TWEEN 20 (mejora la absorción del agente químico en los tejidos vegetales), un lavado en profundidad en agua, inmersión en etanol 70% durante unos segundos, esterilización al vacío y en agitación, puede suponer un aumento en las probabilidades de éxito del proceso.

De este modo se desarrolló un protocolo para la esterilización del material vegetal como aparece en el esquema (Fig.2).

En primer lugar, se seleccionaron las ramas de plantas procedentes de macetas cultivadas en un invernadero que presentaban un buen crecimiento.

A continuación, se trocearon y se lavaron con agua de grifo durante 30 minutos para pasar más tarde por etanol 70% durante 15 segundos. Este paso sólo se realizó en algunas de las esterilizaciones del material.

Posteriormente, se sumergieron en un recipiente con lejía (hipoclorito de sodio) al 30% y se le añadieron 5 gotas de TWEEN 20. Pasados 15 minutos en el agente esterilizante se procedió al lavado de las ramas con agua destilada con el objetivo de eliminar completamente el hipoclorito. Huelga mencionar que para la eliminación del agente esterilizante se emplearon enjuagues a diferentes tiempos, siendo el primero de 2-3 minutos (Fig.3), y los dos siguientes de 10-15 minutos antes de proceder a la obtención de explantes.

Una vez completada la esterilización se realizaron los cortes de explantes. En el caso de este trabajo se partió de dos tipos de explantes, segmentos nodales y explantes de hoja (Fig.4) para iniciar el establecimiento del cultivo.

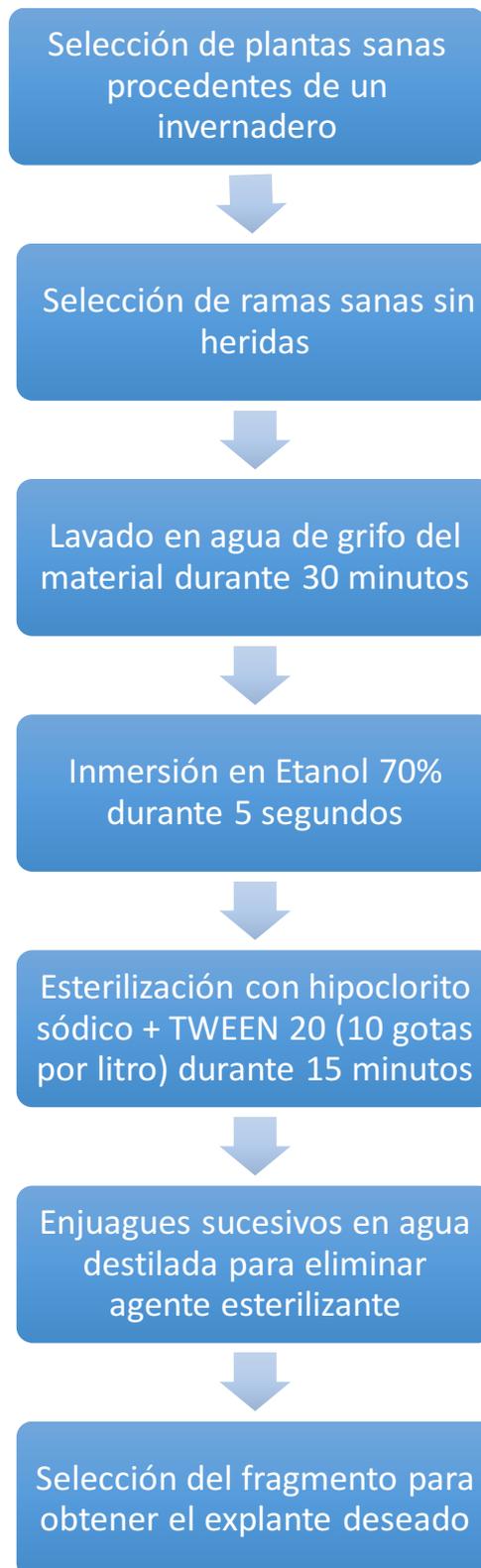


Figura 2. Protocolo empleado para la esterilización de los segmentos nodales y explantes de hoja de *Lavandula dentata*.



Figura 3. Enjuague del material vegetal tras su paso por el agente esterilizante.

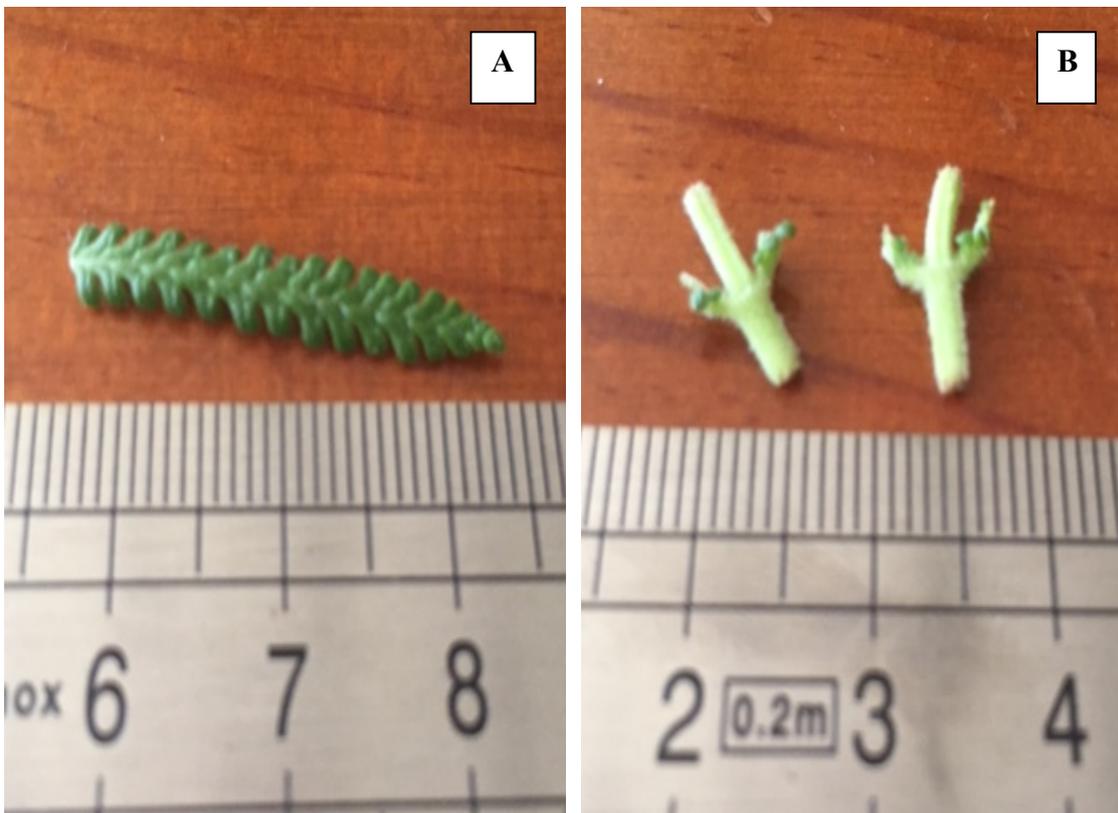


Figura 4. Explantes empleados para el cultivo *in vitro* de *Lavandula dentata* antes de su esterilización. A. Hoja. B. Segmentos nodales.

3.3. Medios de cultivo

Para la siembra de los diferentes tipos de explantes se elaboraron una serie de medios de cultivo que presentaban tratamientos hormonales característicos según el tipo de explante a cultivar en ellos.

El medio de cultivo representa el soporte físico-químico para el establecimiento, desarrollo y multiplicación del material vegetal bajo unas condiciones controladas expuestas en los protocolos de micropropagación. El medio de cultivo contiene componentes tan necesarios como el agua, una fuente de carbono, sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento y agentes solidificantes. En algunos casos se suelen incorporar extractos complejos que mejoren el aporte nutritivo del medio.

Para el desarrollo del experimento planteado se usó el medio de Murashige & Skoog (1962) (Fig.5) al 100% de su concentración salina al que se adicionaron diferentes reguladores de crecimiento que se expondrán más tarde con todo detalle.

Para la elaboración de dichos medios se utilizaron soluciones madre de micronutrientes, macronutrientes, aminoácidos y vitaminas. Estas soluciones se conservaron en botellas de 1 litro, en el frigorífico. Las soluciones madre de macronutrientes se concentraron 10 veces, mientras las soluciones madres de micronutrientes y aminoácidos se concentraron 100 veces. El hecho de preparar las soluciones madre de macronutrientes en una concentración 10 veces y no 100 como en el resto, fue por precaución para evitar la precipitación de las sales durante su almacenamiento en el frigorífico. Por otro lado, la fuente de carbono escogida y más usual fue la sacarosa que proporciona poder reductor, energía a la planta, esqueletos carbonados y participa en la regulación osmótica. Finalmente se seleccionó agar como el agente solidificante, un polisacárido de elevado peso molecular que confiere cierta consistencia al medio permitiendo que en este se pueda fijar el material vegetal.

Al medio nutritivo se le añadieron reguladores de crecimiento, que actúan como señales químicas que favorecen la comunicación entre las células y la coordinación entre ellas durante el desarrollo y crecimiento vegetal. La estimulación hormonal del crecimiento viene dada por los siguientes tipos de reguladores: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico entre otros, siendo los dos primeros los tipos empleados en los tratamientos de este trabajo.

Las auxinas fueron las primeras hormonas vegetales descubiertas. La más conocida es el ácido indol-acético (AIA), pero destacan también el ácido indol-butírico (AIB) y las auxinas sintéticas como el ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2-4D) y el ácido naftalenacético (ANA). Este

tipo de hormona vegetal se caracteriza por su uso en la formación de embriones somáticos, en

MEDIO DE MURASHIGE & SKOOG
Mezcla basal de sales minerales y vitaminas

CaCl ₂	332.02	mg/l	2.99	mM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		0.11	μM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		0.10	μM
FeNaEDTA	36.70		0.10	mM
H ₃ BO ₃	6.20		0.10	mM
KH ₂ PO ₄	170.00		1.25	mM
KI	0.83		5.00	μM
KNO ₃	1900.00		18.79	mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00		1.50	mM
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90		0.10	mM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		1.03	μM
NH ₄ NO ₃	1650.00		20.61	mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60		29.91	μM
glicina	2.00		26.64	μM
meso-inositol	100.00		0.56	mM
ácido nicotínico	0.50		4.06	μM
piridoxina HCl	0.50		2.43	μM
tiamina HCl	0.10		0.30	μM
	4594.65	mg/l		

Murashige T. and Skoog F.
Physiol. Plant, 15, 473 (1962)

Figura 5. Mezcla basal de sales minerales y vitaminas del medio de Murashige & Skoog (1962).

la inducción y formación de callos, así como en la inducción y multiplicación de yemas axilares en combinación con citoquininas. Al mismo tiempo favorecen el enraizamiento de microesquejes. Por dichos motivos han sido incluidas en los medios de cultivo empleados en el presente trabajo con el fin de estimular la callogénesis y la inducción y formación de yemas axilares en combinación con citoquininas.

Por otro lado, en 1956 Skoog y colaboradores descubrieron la primera citoquinina, la quinina que, como las citoquininas de origen natural, se derivan de la base púrica adenina. Las citoquininas pueden encontrarse de forma libre o formando conjugados con otros compuestos como nucleósidos y glucósidos entre otros. Una de las más usadas es la benciladenina (BA). Estos reguladores de crecimiento suelen emplearse para la inducción y formación de yemas axilares en combinación con las auxinas, como se ha mencionado anteriormente, también pueden intervenir junto con esas hormonas en la inducción de callos y participar en la maduración de embriones somáticos.

El protocolo para la elaboración de los medios de cultivo siguió siempre el mismo guion variando las concentraciones de reguladores de crecimiento empleados y su tipo según el tratamiento. Cada medio elaborado tuvo un volumen final de 500 ml que se distribuyó en gradillas de 24 tubos de ensayo. Así es como, partiendo de un matraz de 500 ml como recipiente principal se añadieron en las cantidades adecuadas mediante pipetas y probetas los macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y sales minerales. Una vez incorporados, se continuó con el mesoinositol, además de agua destilada para ayudar a disolverlo. El siguiente compuesto en añadirse fue la sacarosa junto con el agua destilada hasta alcanzar un volumen de 250 ml. Una vez disuelta en su totalidad la sacarosa, se incorporaron con la ayuda de una pipeta los reguladores de crecimiento que forman parte del tratamiento teniendo en cuenta que las cantidades deben estar acordes con el volumen final.

Por otra parte, un matraz de 250 ml de volumen se rellenó con agua destilada y el agar necesario ya estipulado según los protocolos. Dicho matraz se introdujo en un microondas para preparar el agar. En el momento en que se consiguió un líquido de aspecto translúcido, este se incorporó al matraz de 500 ml que contenía la solución nutritiva con los reguladores de crecimiento añadiéndose agua

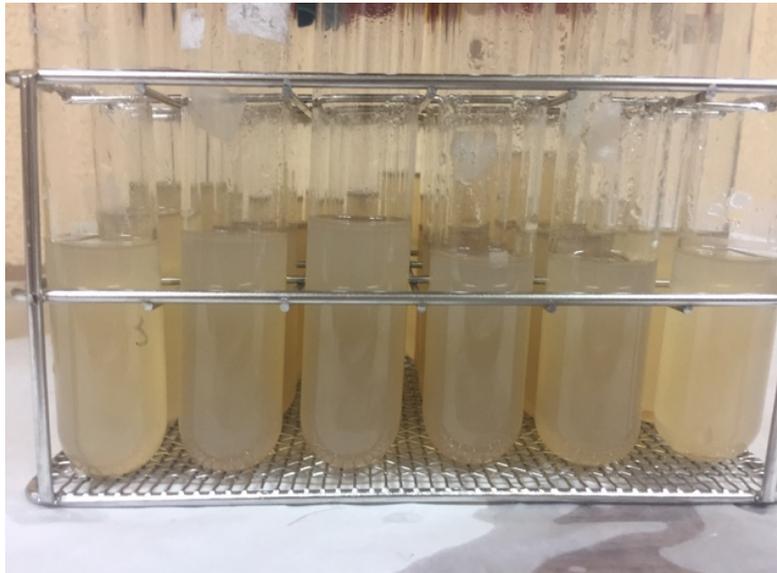


Figura 6. Tubos de ensayo con los medios nutritivos listos para esterilizar

destilada hasta conseguir el volumen deseado de solución. Seguidamente, se procedió a medir el pH para comprobar que se encontraba dentro del rango idóneo para el desarrollo del material

vegetal sin efectos negativos. Es importante tener en cuenta que un pH muy bajo puede provocar que las sales minerales precipiten, que el medio no solidifique y que algunos reguladores de crecimiento pierdan estabilidad. Al mismo tiempo, un pH alto puede afectar a su solidificación y a la hidrólisis de algunos componentes del medio. Para el ajuste del pH entre 5,6-6,4 se emplearon soluciones 1N de NaOH y HCl. Finalmente, el medio se distribuyó en los tubos de ensayo que ocupaban la gradilla, los cuales se cubrieron con tapas y se introdujeron en el autoclave para su esterilización a 0,5 atm durante 20 minutos (Fig.6).

Los tratamientos empleados para la micropropagación de yemas axilares fueron:

1. BA 0,5 mg/L (2.22 μ M)
2. BA 1 mg/L (4.44 μ M)
3. BA 2 mg/L (8.88 μ M)
4. BA 0,5 mg/L + AIB 0,5 mg/L (2.22 μ M + 2.46 μ M)
5. BA 1 mg/L + AIB 0,5 mg/L (4.44 μ M + 2.46 μ M)
6. BA 0,5 mg/L + ANA 0,5 mg/L (2.22 μ M + 2,689 μ M)
7. BA 1 mg/L + ANA 0,5 mg/L (4.44 μ M + 2.69 μ M)

Los tratamientos para la micropropagación por embriogénesis somática fueron:

1. 2,4-D 0,5 mg/L (2.26 μ M)
2. 2,4-D 1 mg/L (4.52 μ M)
3. 2,4-D 2 mg/L (9.05 μ M)
4. 2,4-D 3 mg/L (13.56 μ M)

3.4. Siembra del material vegetal

Una vez los medios han sido esterilizados y se ha realizado la esterilización del material vegetal, se procedió con la siembra bajo unas condiciones controladas de asepsia aseguradas en la cabina de flujo laminar (Fig.7). Este espacio dispone de una lámpara que emite luz ultravioleta cuando no está en uso para favorecer la eliminación de microorganismos sobre la superficie de trabajo. Sin embargo, pese a las características que presenta la



Figura 7. Cabina de flujo laminar cabina

es importante mantener limpia la poyata aplicando alcohol 70% antes de su uso, durante el proceso de siembra de manera periódica y tras acabar de usar el espacio. Además, el usuario, al ser una posible fuente de contaminación, debe mantener sus mangas remangadas y aplicarse alcohol en manos y brazos de forma periódica.

Dentro de la cabina se dispuso el material de siembra de una forma ordenada, para facilitar un desempeño cómodo de las tareas sin afectar a la asepsia del lugar. La cabina dispone además de un esterilizador eléctrico, que contiene pequeñas esferas de vidrio que se calientan a 250°C donde se introduce el material de siembra como bisturíes y pinzas durante 15 segundos antes y después de su utilización (Fig.8).



Figura 8. Esterilizador eléctrico

Es importante encender el esterilizador media hora antes de la siembra para que alcance su temperatura óptima, y se realice la esterilización de pinzas y bisturíes antes de comenzar a trabajar. Al mismo tiempo, se distribuyeron las gradillas con los medios nutritivos, las placas de Petri esterilizadas para realizar la selección de los explantes, los recipientes con el material vegetal ya estilizado y un recipiente con agua destilada para enfriar el material de siembra con el fin de evitar que pueda dañar el material vegetal.

Una vez organizado el espacio de trabajo se prosiguió con el inicio de la siembra de los explantes en los medios nutritivos seleccionados. Para comenzar, con las pinzas esterilizadas se tomó el material vegetal de los frascos de vidrio y se situó en las placas de Petri. Entonces, con la ayuda de un bisturí se seleccionaron los explantes adecuados retirando las partes no deseadas de las ramas, tallos u hojas. En nuestro caso, se aislaron segmentos nodales y explantes de hoja. Después del aislamiento se continuó con la siembra de los explantes en los diferentes medios de cultivo, colocándose las hojas en posición horizontal y los segmentos nodales en posición vertical. Este proceso descrito se repitió de manera continua hasta sembrar todas las gradillas.

Finalmente, el material sembrado se trasladó a la cámara de cultivo anexa a la cabina de flujo laminar bajo unas condiciones de temperatura, humedad y luz controladas para que se produzca el desarrollo vegetal deseado (Figura 9.).

Condiciones de Incubación	
Temperatura	20°C ± 2°C
Humedad	50%-60%
Fotoperiodo	16 Horas de luz y 8 horas de oscuridad
Irradiancia	110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Tipo de lámparas	Blancas (Philips TLD, 58W-84)

Figuras 9. Condiciones de incubación de la cámara de cultivo.

4. Resultados

4.1. Efecto de BA sobre el establecimiento de segmentos nodales

Los tratamientos que emplearon solamente BA como regulador de crecimiento en diferentes concentraciones presentaron los efectos reflejados en la Tabla 1. De este modo, se observó que a medida que las concentraciones se incrementaban en el medio de cultivo la efectividad para el desarrollo de yemas disminuía de forma escalonada. Es así como el medio de MS + BA 0,5 mg/L presentó el mayor porcentaje de establecimiento (83%) (Fig.10) mientras el medio MS + BA 2 mg/L mostró el menor porcentaje de establecimiento (54%). Es así como, todos los tratamientos con BA mostraron un porcentaje por encima del 50% de éxito de yemas axilares establecidas (Fig. 11).

Sin embargo, en lo referente al tiempo requerido para el establecimiento de las yemas se pudo observar que existió una similitud entre los diferentes medios de cultivo realizados, no siendo un aspecto relevante en este caso al existir un rango de entre 19-21 días.

El porcentaje de contaminación no superó el 25%, siendo el medio MS + BA 1 mg/L el que presentó el nivel más alto. Mientras, los niveles de contaminación encontrados en 0,5 mg/L BA fueron bajos (17%). Cabe mencionar que en el caso del medio MS + BA 2 mg/L la contaminación no existió.

Por último, en lo referente al porcentaje de explantes sin yemas establecidas, se pudo observar que el medio MS + BA 2 mg/L fue el único que mostró problemas para el establecimiento de las yemas, con un valor del 46%.

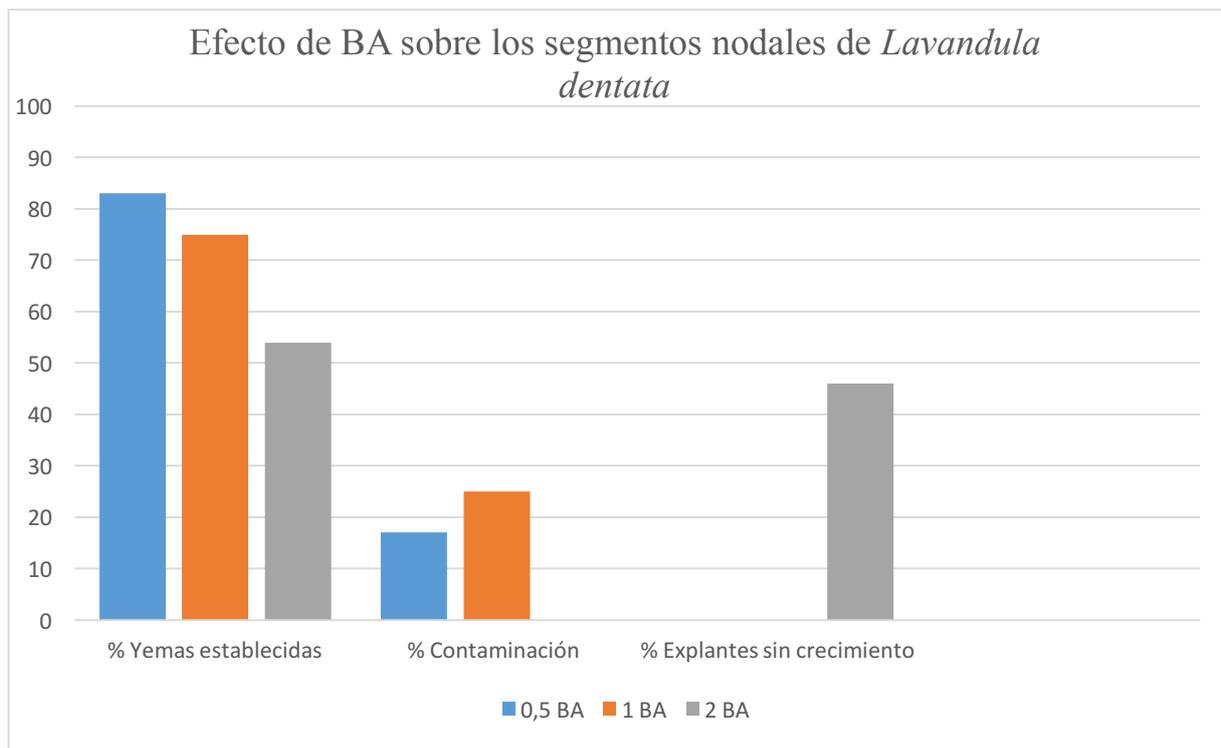


Figura 10. Efecto de la BA sobre el establecimiento de los segmentos nodales de *L. dentata*.

Medio de Cultivo	Días requeridos para el establecimiento	Porcentaje de yemas establecidos	Porcentaje de contaminación
MS + BA 0,5 mg/L	19 ± 2	83% ± 5,56	17% ± 5,56
MS + BA 1 mg/L	21 ± 3,60	75% ± 2,64	25% ± 2,64
MS + BA 2 mg/L	20 ± 1	54% ± 4,58	0%

Tabla 1. Efecto de la BA en diferentes concentraciones sobre el establecimiento de segmentos nodales, así como el porcentaje de contaminación y días requeridos para su establecimiento. Cada tratamiento se realizó por triplicado.



Figura 11. Yemas establecidas tras 18 días de la siembra de los segmentos nodales en un medio MS con 2 mg/L BA.

4.2. Efecto de BA en combinación con auxinas sobre el establecimiento de segmentos nodales

En cuanto al efecto de la combinación de auxinas y citoquininas en el establecimiento de segmentos nodales se observaron los resultados expuestos en la Tabla 2. De este modo, la combinación de BA y AIB que mejor porcentaje de establecimiento presentó fue aquella con igual concentración de ambos reguladores (0,5mg/L BA + 0,5 mg/L AIB), mostrando un 96% de explantes establecidos (Fig.12). Paralelamente, la combinación de BA y ANA con la que se obtuvo un mayor porcentaje de explantes establecidos (37,5%) fue aquella con igual concentración de reguladores de crecimiento (0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L ANA). En lo referente a los días necesarios para el establecimiento se observó que eran necesarios de 15-17 días para conseguir este objetivo.

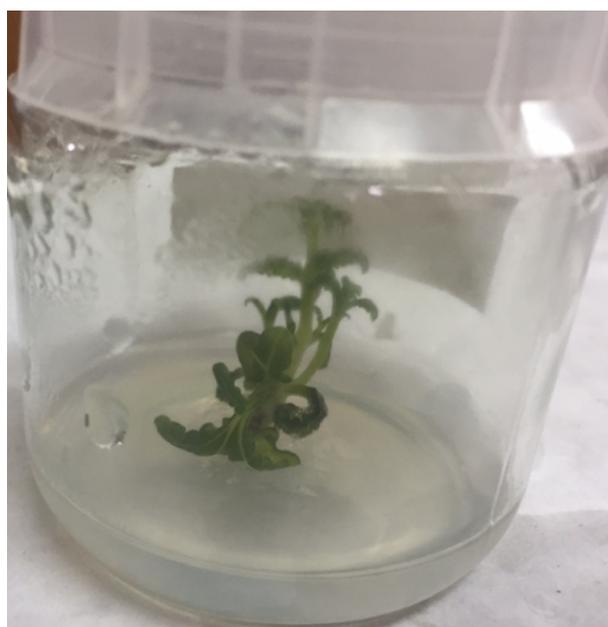


Figura 12. Yemas de *Lavandula dentata* desarrolladas *in vitro* tras 33 días de la siembra de los segmentos nodales en un medio MS con 0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L de AIB.

Medio de cultivo	Días requeridos para el establecimiento	Porcentaje de yemas establecidos	Porcentaje de contaminación
MS + BA 0,5 mg/L + AIB 0,5 mg/L	17 ± 5,29	96% ± 3,21	0%
MS + BA 1 mg/L + AIB 0,5 mg/L	15 ± 3	33,3% ± 1,73	37,5% ± 1,73
MS + BA 0,5 mg/L + ANA 0,5 mg/L	15 ± 2	37,5% ± 3,07	25% ± 3,07
MS + BA 1 mg/L + ANA 0,5 mg/L	16 ± 2	21% ± 3,60	46% ± 3,60

Tabla 2. Efecto de la combinación de auxinas y citoquininas sobre el establecimiento de segmentos nodales así como el porcentaje de contaminación de explantes y porcentaje de éxito de explantes establecidos. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

El porcentaje de contaminación más elevado se obtuvo en el medio MS + 1 mg/L BA + 0,5 mg/L ANA con un 46% de los explantes contaminados (Fig. 13). En este mismo medio se observó que algunos explantes presentaban desarrollo de callos en la parte basal, suponiendo un 25% del total, mientras que un 8% no se vio influenciado por el uso de estos reguladores y no existió inducción de yemas axilares (Fig.14). En el medio 0,5mg/L BA + 0,5 mg/L AIB una vez realizado un subcultivo en frascos de vidrio, tras dos semanas se pudo observar que muchos explantes mostraron ennegrecimiento en la parte basal. Este hecho podría deberse a un agotamiento de los nutrientes presentes en el medio o bien por una liberación de compuestos fenólicos como resultado de los cortes realizados en esta zona durante la siembra. (Fig. 15).



Figura 13. Contaminación fúngica observada tras la siembra de los explantes en un medio de cultivo con 1 mg/L BA + 0,5 mg/L AIB.

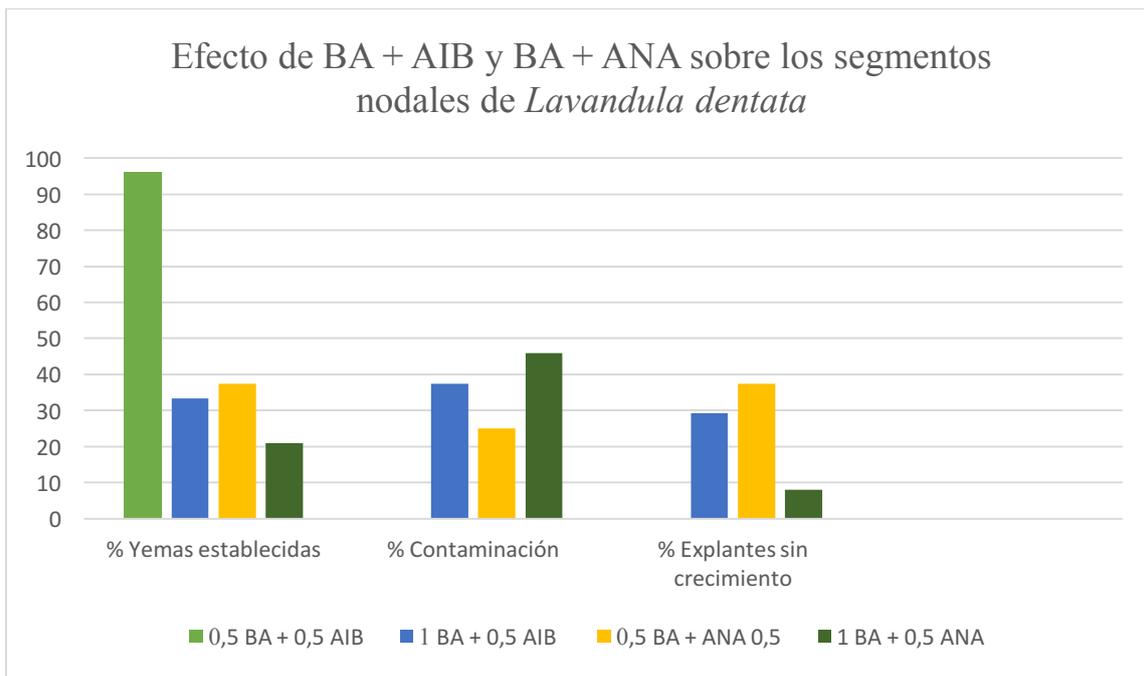


Figura 14. Efecto de BA + AIB y BA + ANA sobre el establecimiento de segmentos nodales de *L. dentata*.



Figura 15. Necrosis en la parte basal de un cultivo de yemas axilares establecido en frasco de vidrio tras 38 días.

4.3. Efecto de 2-4 D sobre la callogénesis en explantes de hoja de *Lavandula dentata*

Tras llevar a cabo las siembras en los diferentes medios con las concentraciones mencionadas en el anterior apartado se observó el efecto de estos sobre las hojas de la planta usadas como material de partida ya descritas en el apartado de material y métodos (Tabla 3.).

Medio de cultivo	Días requeridos para la iniciación de callogénesis	Porcentaje de explantes de hoja establecidos	Porcentaje de contaminación
MS + 2,4-D 0,5 mg/L	16 ± 3,61	37,5% ± 2,64	12,5% ± 2,64
MS + 2,4-D 1 mg/L	16 ± 4,59	83% ± 4,59	17% ± 4,59
MS + 2,4-D 2 mg/L	11 ± 2,64	92% ± 3,61	8% ± 3,61
MS + 2,4-D 3 mg/L	12 ± 3,61	66,7 ± 4,46	33,3% ± 4,46

Tabla 3. Efecto del 2,4-D en diferentes concentraciones sobre la callogénesis en explantes de hoja de *Lavandula dentata*. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

El efecto de la auxina 2,4-D en la inducción y formación de callos en explantes de hoja de *L. dentata* mostró una media de 11-16 días para la iniciación de la callogénesis. De las cuatro concentraciones usadas del regulador, la que mejor resultado mostró fue el medio con 2 mg/L 2,4-D. Este medio presentó un 92% de explantes en los que se observó callogénesis (Fig.16 y Fig. 17.). El medio 1 mg/L 2,4-D manifestó un 83% de éxito en el establecimiento de callos, por lo que se trata de un valor bastante alto a tener en cuenta. Mientras, los medios con las concentraciones de 2,4-D más baja (0,5 mg/L 2,4-D) y más alta (3mg/L 2,4-D) mostraron un descenso en el porcentaje de éxito en el establecimiento (Fig.18).

En la Figura 16 se puede observar la formación de microcallos formados por masas de células meristemáticas creciendo activamente.

Po otro lado, la Figura 17 pone de manifiesto que la formación de callos tuvo lugar a lo largo de todo el explante de hoja, llegando a cubrirlo con una masa de células de color verde pálido.

En lo que se refiere a la contaminación de los callos se observó que el medio de 3mg/L 2,4-D presentó los niveles más altos con respecto a los otros medios usados, siendo 33,3 % el valor. Mientras el medio con 2 mg/L 2,4-D obtuvo los valores más bajos de contaminación al mostrar un 8%. Sin embargo, huelga mencionar que el medio de 0,5 mg/L 2,4-D presentó unos niveles bajos de contaminación (12,5%), pero el 50% de los explantes cultivados en dicho medio resultaron no evidenciar un desarrollo de callos en la superficie.

Evidentemente, estas diferencias en los porcentajes de contaminación no pueden ser debidas a la composición del medio sino a la manipulación de material durante el proceso de esterilización y siembra. También podría darse el caso de que algunos explantes tuvieran algún tipo de contaminación endógena previa.

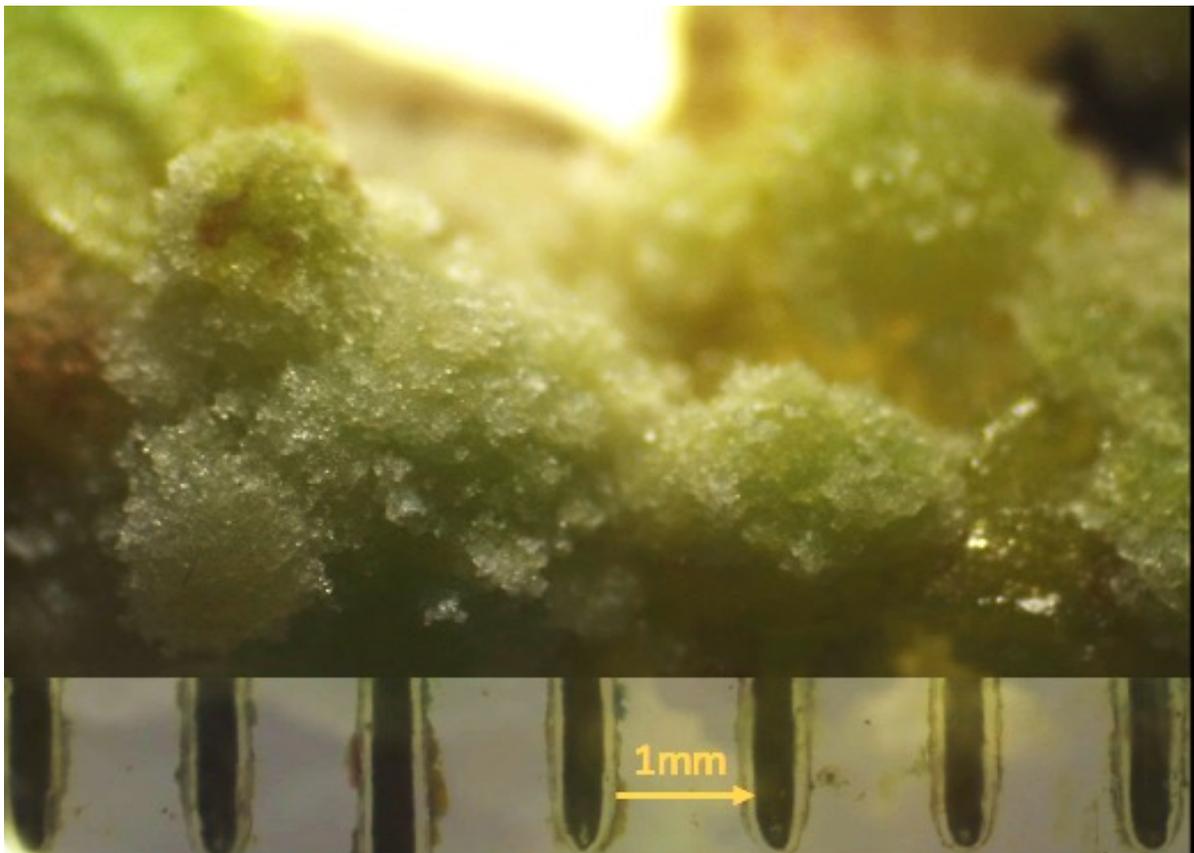


Figura 16. Fotomacrografía de los callos inducidos en medio MS con 2mg/L 2,4-D tras 26 de cultivo.



Figura 17. Fotomacrografía de una hoja de *L. dentata* con presencia de callo tras 26 días de cultivo en medio MS con 2 mg/L 2,4-D .

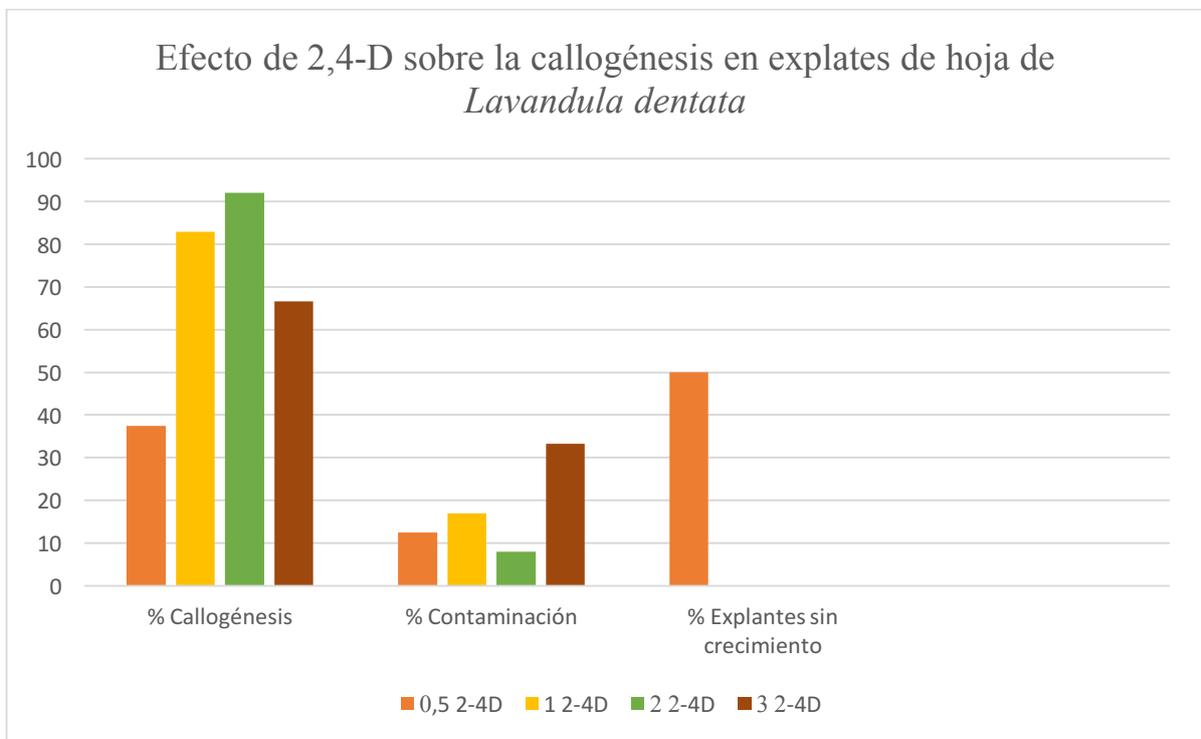


Figura 18. Efecto de 2,4-D sobre el establecimiento de callos en hojas de *Lavandula dentata*

5. Discusión

La respuesta mostrada usando como explantes segmentos uninodales para la inducción y formación de yemas axilares bajo el efecto de la benciladenina (BA) en diferentes concentraciones ha sido más que positiva. Partiendo del medio MS (Murashige & Skoog 1962) con una concentración de 2.22 μM BA se ha obtenido un porcentaje de más del 83% de éxito en el establecimiento, evidenciando que el uso de esta citoquinina en esta fase del protocolo de micropropagación por el método de yemas axilares es adecuado. Además, se comprobó que incorporando concentraciones más altas BA al medio MS el porcentaje de establecimiento disminuía llegando a niveles del 54% en el medio con la concentración de 8.88 μM BA. El uso de 2 μM BA con medio MS para la inducción de yemas en segmentos nodales de *Lavandula vera DC* (Andrade et al., 1999) mostró buenos resultados aunque el aumento en las concentraciones de este regulador significó la aparición de cultivos hiperhídricos. Este hecho no tuvo lugar en este experimento pese al uso de concentraciones altas del regulador quizás por tratarse de especies diferentes las respuestas no han coincidido en este aspecto. En el caso de experimentos anteriores con *Lavandula dentata* (Jordan et al., 1998), se utilizaron entre otros reguladores BA en concentraciones de 0.5 μM , 2 μM , 5 μM , 20 μM y 40 μM . Los resultados de este trabajo mostraron que a partir de los 15 días se observaba un desarrollo de los segmentos nodales, en el nuestro las primeras evidencias de crecimiento en los explantes aparecieron tras 19 días, existiendo una cierta similitud temporal. Al mismo tiempo, se obtuvieron unos porcentaje de 50-68% de éxito en los medios que presentaban BA, siendo las concentraciones idóneas aquellas entre 2-5 μM . En nuestro caso las concentraciones iban de 2.22-8.88 μM representado un cierto paralelismo entre los tratamientos adecuados para un buen crecimiento de las yemas.

Por otro lado, al observar los resultados de los efectos de las citoquininas y auxinas en combinación en el medio MS se puede poner de manifiesto que existe una diferencia entre los efectos causados dependiendo de la auxina usada para acompañar a BA en el tratamiento utilizado. Existieron dos tratamientos de BA junto con AIB mostrando comportamientos diferentes en el éxito en la fase de establecimiento. En el caso del uso de 2.22 μM BA + 2.46 μM AIB en el medio supuso un elevado porcentaje de éxito (96%) en el desarrollo de yemas axilares. Sin embargo, al aumentar la concentración BA (4.44 μM BA + 2.46 μM AIB) se produjo una gran reducción en el número de cultivos establecidos (33,3%). Por otro lado, escogiendo como auxina ANA junto con BA y empleando las mismas concentraciones que en el caso anterior, las diferencias en los porcentajes de establecimiento no fueron tan llamativas

al obtenerse en ambos casos valores por debajo del 50%. De este modo, el medio con 2.22 μM BA + 2.69 μM ANA (2.69 μM) exhibió un 37,5% de explantes establecidos por un 21% en el medio con 4.44 μM BA + 2.69 μM ANA.

Otras auxinas, como el ácido indolacético (AIA) han sido incluidas junto con BA en medios MS junto con extractos complejos (leche de coco al 20%) para mejorar la fase de establecimiento (Sanchez-Gras & Calvo, 1996). En ese experimento, llevado a cabo en *Lavandula latifolia*, utilizaron 0.57 μM AIA y 8.88 μM de BA como medios para los subcultivos de explantes una vez desarrolladas las yemas axilares en BA o quinolina de forma individual o combinados con ANA. Estas combinaciones no fueron muy positivas y el uso de BA como único regulador de crecimiento expresó los mejores resultados. En el caso de estudios llevados a cabo en la misma especie objeto de este trabajo, se comprobó que el uso de BA en varias concentraciones junto con 0,5 μM ANA mostraba una disminución en el número de yemas formadas en los explantes lo que podría fundamentar que en este trabajo las tasas de éxito en el establecimiento sean más bajas que en los tratamientos donde solo se emplea BA a excepción del alto porcentaje exhibido por 2.22 μM BA + 2.46 μM AIB.

Por último, los tratamientos empleados para la callogénesis en las hojas revelaron que los mejores resultados (66-92%) se obtuvieron cuando se adicionó al medio entre 4.54-13.56 μM 2,4-D. Con las mencionadas concentraciones aparecieron callos de color verde con trazas blanquecinas ocupando la mayoría del volumen de las hojas utilizadas como explantes (Fig.16 y Fig. 17). Como era de esperar por lo tanto, la auxina 2,4-D evidenció que se trata de un buen regulador para la inducción y formación de callos en hojas de *Lavandula dentata*. Estas afirmaciones se sustentan en trabajos (Guadarrama-Flores, et al., 2012; Ramírez et al., 2004) en los que se aplicaron tratamientos con 2,4-D. En uno de los casos (Guadarrama-Flores et al., 2012), hojas de *Lavandula angustifolia* fueron sembradas en medios con BA (0, 6.66 y 8.88 μM) y 2,4-D (0, 6.79 y 9.065 μM) así como en medios con BA (0, 6.66 y 8.88 μM) y ANA (0, 8.05 y 10.74 μM). De este modo, elevados valores de callogénesis se obtuvieron en los tratamientos de 2,4-D y BA (86-100%).

Por otra parte, en estudios más recientes (Ramírez et al., 2004), los tratamientos que sirvieron para la inducción de callos en hojas jóvenes de *Lavandula angustifolia* requirieron la combinación de ANA, 2,4-D y BA en concentraciones de 0-2mg/L, resultando la mayor producción en los medios suplementados con 6.66 μM 2-4D + 6.78 μM BA (76,67%). Sin embargo, se han notificado resultados negativos en la inducción de callos en yemas de *Lavandula dentata* (De Bona et al., 2011). En el mencionado trabajo los tratamientos para la formación de callos usados fueron combinaciones de BA, 2,4-D y ácido giberélico. Dichos

tratamientos no provocaron la aparición de callos en la especie *L. dentata*, por lo que se omitieron los experimentos con esta y se mantuvieron sólo con *Lavandula angustifolia*. Quizás el uso de tratamientos suplementados con diferentes reguladores de crecimiento variando las concentraciones de estos, además del uso de un explante tipo diferente para la inducción y formación de callo sean las explicaciones responsables de los resultados obtenidos. Sin embargo, cabe mencionar que en nuestro trabajo cuando se cultivaron segmentos nodales en medios con 4.44 μM BA + 2.69 μM ANA se produjo la formación de callos en la parte basal del segmento, por lo que podría resultar una vía para este método de micropropagación en segmentos nodales.

6. 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 del género *Lavandula* se exponen una serie de conclusiones:

1. El protocolo de esterilización empleado para los segmentos nodales y hojas de *Lavandula dentata* fue adecuado para la iniciación del cultivo *in vitro*, obteniéndose porcentajes de contaminación aceptables en ambos casos.
2. El uso de segmentos nodales como explante tipo para la micropropagación por yemas axilares ha sido efectivo para *Lavandula dentata*.
3. El medio MS (Murashige & Skoog, 1962) al 100% de concentración salina suplementado con benciladenina (BA) y ácido indol-butírico (AIB) (0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L AIB) ha sido el más efectivo para la inducción y desarrollo de las yemas axilares de *Lavandula dentata*.
4. La auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) fue efectiva en el desarrollo de la callogénesis a partir de explantes de hoja de *Lavandula dentata*.
5. El medio MS Murashige & Skoog, 1962) al 100% de concentración salina suplementado con 2 mg/L 2,4-D ha mostrado una alta capacidad para la inducción y formación de callos en las hojas de la planta de estudio.

Es evidente que en esta materia todavía queda mucho por descubrir y conocer, pues pese a llevar décadas realizándose de forma continua experimentos y estudios de plantas del género

Lavandula, las diferencias en las respuestas de los genotipos a los reguladores de crecimiento son de los más variados. Es así como sería importante aunar esfuerzos y dedicación para comprender más y mejor cuáles son los tratamientos más idóneos para optimizar las fases de un protocolo de micropropagación *in vitro* tanto en plantas del género *Lavandula* como en otras de interés comercial con el fin de aprovechar los recursos de los que la biotecnología vegetal dispone para aumentar el éxito de la producción vegetal en el sector agrícola.

7. Conclusions

Once we analyzed our data and we compared with the results achieved by other researchers dedicated to the *in vitro* micropropagation of species of genus *Lavandula*, we can show the next conclusions:

1. The sterilization protocol used for nodal segments and leaves of *Lavandula dentata* was suitable for the initiation of *in vitro* culture, achieving percentages of pollution acceptable in both cases.
2. The use of nodal segments as explant type for the axillary buds micropropagation has been effective for *Lavandula dentata*.
3. The MS medium (Murashige & Skoog, 1962) of 100% salts concentration supplemented with benzyladenine (BA) and indole butyric acid (IBA) (0,5 mg/L de BA + 0,5 mg/L IBA) has been the most effective for the induction and development of axillary buds of *Lavandula dentata*.
4. The auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was effective for the callus initiation from leaves of *Lavandula dentata*.
5. The MS medium (Murashige & Skoog, 1962) of 100% salts concentration supplemented with 2 mg/L 2,4-D was the most effective for the induction and formation of callus on leaves of the plant of study.

In conclusion, it is clear that in this matter there is still much to discover and know. Despite decades of continuous experiments and studies of plants of the *Lavandula* genus. The differences in the responses of genotypes to growth regulators are common. So, it would be important to combine efforts and dedication to understand more and better which are the most suitable treatments to optimize the phases of an *in vitro* micropropagation protocol in plants of the *Lavandula* genus as well as in others of commercial interest in order to take advantage of

the resources available in vegetal biotechnology to increase the success of vegetal production in the agricultural sector.

8. Bibliografía

- Andrade, L. B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G. F., & Rota, L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 56(2), 79–83. <https://doi.org/10.1023/A:1006299410052>
- Calvo, M. C., & Segura, J. (1989). *In vitro* propagation of Lavender. *HortSci*. (Vol. 24). The Society. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=6814204>
- De Bona, C. M., Reinhart, V., Biasi, L. A., & Zanette, F. (2011). Organogenesis *in vitro* de *Lavandula dentata* e *Lavandula angustifolia*, *Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras*, v.7, n.2, p. 66-70.
- Guadarrama-Flores, B., Buendía-González, L., Orozco Villafuerte, J., Estrada Zúñiga, M. E., & Cruz-Sosa, F. (2012). Producción en cultivos *in vitro* de los componentes del aceite esencial de *Lavandula agustifolia*. *RLQ. Revista latinoamericana de química* (Vol. 40). Laboratorios Mixim S.A. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432012000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Jordan, A. M., Calvo, M. C., & Segura, J. (1998). Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 73(1), 93–96. <https://doi.org/10.1080/14620316.1998.11510949>
- Margara J. 1984. Bases de la multiplication vegetative. INRA. Versailles. Paris.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- Nobre, J. (1996). *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula Stoechas* from field-grown plants. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 46, 151–155. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030443895&partnerID=40&md5=5d82f2b07f959671a7edbf5d9af8ffe>
- Palá-Paúl, J., Brophy, J. J., Goldsack, R. J., & Fontaniella, B. (2004). Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(1), 55–62.

[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00177-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00177-7)

- Ramírez, L. R., Buendía-gonzález, L., Cruz-sosa, F., & Orozco-villafuerte, J. (2004). Callogénesis y Rizogénesis en cultivos *in vitro* de *Lavandula angustifolia*. *VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes Y Levaduras*, 2(01 722), 1. Acapulco. México.
- Sanchez-Gras, M. C., & Calvo, M. D. (1996). Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 45(3), 259–261. <https://doi.org/10.1007/BF00043639>
- Sudriá, C., Piñol, M. T., Palazón, J., Cusidó, R. M., Vila, R., Morales, C., Bonfill, M. & Cañigüeral, S. (1999). Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 58(3), 177–184. <https://doi.org/10.1023/A:1006377003962>