

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *CYMODOCEA NODOSA* PARA SU UTILIZACIÓN EN LA RESTAURACIÓN DE SEBADALES

Eva Angelina
Pérez Navarro

Pilar Gacia Jiménez
Rafael Robaina Romero

Las técnicas de propagación *in vitro* son consideradas como una de las soluciones más plausibles al declive de las comunidades de fanerógamas que actualmente se registra en todo el mundo. En este trabajo, se establecieron cultivos de *Cymodocea nodosa*, a partir de explantos, que mediante multiplicación vegetativa o formación de callo previo emitieron hojas nuevas en medios que contenían la citoquinina TDZ. Otros reguladores afectaron a la extensión y la regeneración de la hoja.

Los fragmentos, constituidos por hoja, rizoma y raíz, se comportaban como una unidad fisiológica, donde el carbono fijado por la hoja era rápidamente traslocado al resto del tejido. Estos explantos asimilaron preferentemente el amonio y el fosfato inorgánico, siendo indispensable la presencia de tejido sumergido para mantener los niveles de fósforo.

In vitro techniques of plant micropropagation are being considered as a possible solution for the decline in the seagrass communities that has been noticed worldwide. Cultures of Cymodocea nodosa were established from explants of the apical meristeme that regerated new leaves or produced leaf regenerating calli in media containing the cytokinin analogue TDZ.

Longer shoot explants containing internode with leaf and roots behave as a physiological unit, since the carbon fixed at the leaf was rapidly translocated to the rest of the tissue. The explants preferred ammonium and dihydrogen inorganic phosphate as the nutrient source, that were efficiently assimilated, but underground tissue was required to keep P status in the cultivated explants.

INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas en el litoral amenazan a las poblaciones vegetales marinas como *Cymodocea nodosa*, la más común en Canarias, y que define los ecosistemas de los “sebadales”

La fanerógama marina *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson forma densas comunidades de gran importancia ecológica por ser hábitats protegidos y estables donde otros vegetales, animales y biota en general viven, se alimentan y reproducen. En las últimas décadas, la actividad humana ha propiciado una alarmante disminución de estas comunidades (Krishnamurthy & Untamale, 1985; Dennison et ál., 1993; Duarte 1995; Marbá et ál., 1996), siendo las principales causas la contaminación biológica, química y geológica. Considerando que las tasas de reproducción, sexual o vegetativa, de la especie son muy

bajas y que el transplante de fragmentos no ha sido efectivo (Molenaar, 1989; Molenaar & Meinesz, 1992; West et ál., 1990; Molenaar et ál., 1993; Molenaar & Meinesz, 1995), la propagación *in vitro* puede ser una solución admisible para la restauración.

Se entiende por micropropagación de especies vegetales a las diferentes técnicas y estrategias que hacen posible el desarrollo de plantas nuevas a partir de células, tejidos y órganos. A diferencia de la propagación vegetativa natural, esta aproximación permitiría obtener, de forma rápida, mayores cantidades de biomasa a partir de una única planta

(Jewett-Smith & McMillan, 1990; Ellender, 1991; Koch & Durako, 1991; Jones & Ellender, 1991; Bird et ál., 1994). La micropropagación establece tres fases obligatorias: i) el establecimiento del cultivo, ii) la producción de brotes, iii) la producción y el endurecimiento de la raíz para poder plantar en suelo. Desarrollando esta praxis, se han obtenido, por ejemplo, una gran cantidad de individuos saludables a partir de plantas de agua dulce (Huang et ál., 1994; Agrawal & Ram, 1995; Kane et ál., 1999). En especies marinas de relevancia ecológica, como *Posidonia oceanica*, *Ruppia maritima* o *Cymodocea nodosa*, el cuello de botella se encuentra en las etapas de producción masiva de hojas y enraizamiento (Loques et ál., 1990; Koch & Durako, 1991; Terrados-Muñoz, 1995; Bird et ál., 1996, 1998). En este sentido, no existen estudios fisiológicos concisos que arrojen alguna luz sobre la situación nutricional básica de los explantos o plántulas *in vitro* que permita conducir a término las fases ii y iii de la micropropagación. La literatura ecofisiológica dirime la cuestión hacia la importancia de la raíz frente a la hoja como órgano implicado en la absorción de nutrientes (comúnmente nitrógeno y fósforo). La misma situación se presenta respecto a la adquisición, fijación y reparto de carbono durante la fotosíntesis, aunque está claro que las fanerógamas movilizan oxígeno y probablemente carbono desde la hoja hacia tejidos no-fotosintéticos (Pirc, 1986; Pérez, 1994; Terrados & Williams, 1997; Kraemer & Mazzella, 1999; Touchette & Bukholder, 2000 a, b).

Así pues, considerando que el cultivo *in vitro* aporta los mismos requerimientos que aquel *in vivo*, este trabajo pretendía revelar cuáles eran las condiciones nutricionales o el *status* del explanto necesarios para la propagación óptima de plántulas. Se emplearon dos tipos de fragmentos constituidos por meristemo apical solamente u otros internodales con hoja, rizoma y raíz, a modo de plántula.

Las condiciones nutricionales que incluyeron reguladores de crecimiento y fuentes de carbono y nitrógeno permitieron valorar i) el papel de los reguladores y su contribución al crecimiento, ii) la forma química y el tipo preferente en la que son asimilados los nutrientes y iii) la importancia relativa de las partes enterradas y emergidas del explanto en la asimilación. Complementariamente, se documentó la fijación de carbono y su distribución durante la fotosíntesis en las diferentes partes del explanto.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Material vegetal

Los ejemplares de *C. nodosa* fueron recogidos en charcas costeras de 1-2 metros de profundidad en la costa sureste de Gran Canaria, durante el invierno y la primavera de 2001 a 2003 para evitar daños a la población. Se utilizaron dos tipos de explantos, por un lado, los fragmentos cilíndricos, apicales, y axénicos de 0.5 ± 0.1 cm procedentes del rizoma plagiotrópico y, por otro lado, explantos que contenían rizoma internodal, hoja, y raíz (i.e. sección nodal de 3 cm aproximadamente, Figura 1B). Todos ellos fueron esterilizados por inmersión en hipoclorito sódico 1%, seguidos de lavados en agua destilada durante 5 minutos. A continuación, los explantos fueron incubados durante 48 horas en una mezcla de antibióticos, previamente esterilizada por filtración, compuesta por rifampicina, penicilina, nistatina, ampicilina (150 mg l^{-1} cada una) y dióxido de germanio (5 mg l^{-1}). Teniendo en cuenta que este método no preserva los cultivos axénicos cuando se utilizan explantos de 3 cm, también se esterilizó por autoclave el agua de mar, la solución de nutrientes, la arena y los recipientes de cultivo, asegurándose de esta forma la suficiente limpieza como para evitar el sobrecrecimiento de microorganismos y las interferencias por contaminación durante el periodo experimental (15 días).

Las técnicas de propagación *in vitro* son consideradas como una de las soluciones más plausibles al declive de las comunidades de fanerógamas que actualmente se registra en todo el mundo

Se entiende por micropropagación de especies vegetales a las diferentes técnicas y estrategias que hacen posible el desarrollo de plantas nuevas a partir de células, tejidos y órganos. Esta aproximación permitiría obtener, de forma rápida, mayores cantidades de biomasa a partir de un único individuo

La consecución de una propagación exitosa depende en gran medida de la efectividad de los reguladores para, por un lado, inducir un patrón determinado de crecimiento y, por otro, propagar las plántulas que han sido producidas

2. Condiciones de cultivo

El papel de los reguladores de crecimiento durante el crecimiento vegetal se valoró sobre aquellos explantos internodales, cultivados en recipientes de 30 ml de capacidad, mientras que, los explantos apicales axénicos fueron dispuestos en placas de Petri con medio solidificado (agar 0.8%). El medio de cultivo empleado fue de agua de mar enriquecida (PES, 1968) suplementado con sacarosa (60 g l⁻¹), haciéndose necesario el ajuste de la osmolaridad por dilución del agua de mar (Robaina et al., 1990). Los reguladores probados fueron ácido indol-acético 10⁻⁶ M (IAA), ácido indol-butírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina (KIN), benciladenina (BA) y Tidiazu-

rón (TDZ), añadidos al medio tras ser esterilizados por filtración a una concentración de 10⁻⁶ M.

El estudio de las preferencias nutricionales y el papel desempeñado por las diferentes partes del explanto se realizó con explantos internodales cultivados individualmente en recipientes Magenta^R-G7 (Sigma Co.), conteniendo 40 ml de arena esterilizada y 200 ml de medio de cultivo líquido. Para ello, se aplicó un diseño estadístico simplificado de bloques de tipo Box-Behnken (Box-Behnken, 1969) para tres factores (nitrato, glutámico y amonio como fuentes potenciales de nitrógeno, y fosfato potásico inorgánico y gliceraldehído-3-fosfato orgánico para el fósforo) con tres grados de concentración basadas sobre aquellas estimadas para el PES (sin enriquecimiento, medio y enriquecimiento completo: 0, 0.05, 0.1 mM y 0, 0.5, 1 mM en fósforo y nitrógeno, respectivamente) y tres puntos centrales (controles). La variable de respuesta al crecimiento (GH, pigmentación y estado general) se cuantificó al final del periodo experimental, adjudicándosele los siguientes valores: GH=1 no hay evidencias del cambio o incluso se encuentran síntomas de degeneración, GH=2 explanto sano y pigmentado, y GH=3 sano y regenerando nuevas hojas (Figura 1 C,D). El diseño experimental se repitió dos veces, con cinco réplicas cada vez, obteniéndose los mismos resultados.

3. Asimilación de nutrientes y fijación del carbono

El modelo de Box-Behnken constató que las formas químicas preferidas por la planta eran el N reducido y el P inorgánico. Así pues, se diseñaron experimentos univariantes de corto plazo (48 h) para determinar si estos nutrientes eran absorbidos por el explanto preferentemente por el tejido emergido o desde la arena enriquecida (mediante el tejido sumergido). En cada recipiente de cultivo, el agua y/o la arena fueron enriquecidas con amonio (1 mM) o KH₂PO₄

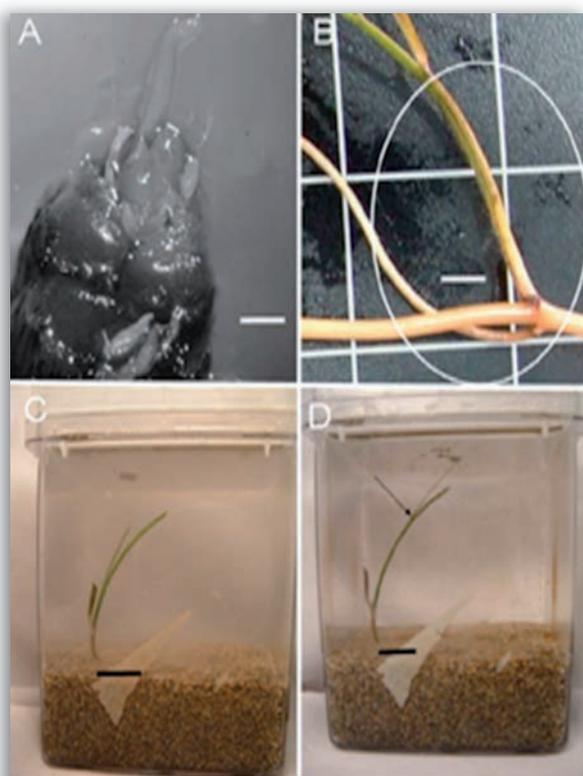


Figura 1. Cultivo *in vitro* de *Cymodocea nodosa*. **A.** Hoja con regeneración de callo creciendo a partir de un explanto obtenido de un meristemo apical monopodial, obtenido después de 15 días en medio complementado con 10⁻⁶ M de citoquinina sintética TDZ. **B.** Explantos usados en este estudio que contienen una sección nodal con nodo, hojas y raíces asociadas. **C-D.** Crecimiento de explantos después de 15 días en recipientes de cultivo con arena y medio de cultivo líquido. (Nótese la extensión de las hojas hacia la superficie, indicado con flecha). Barra de escala de 0.2 cm en A y 1 cm en el resto.

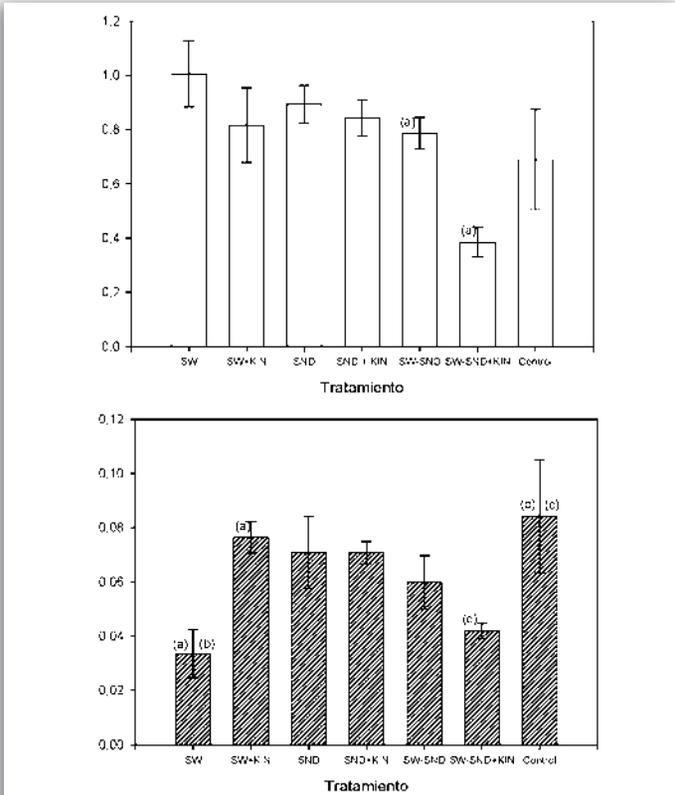


Figura 3. Asimilación de nitrógeno (%N) y fósforo (%P) por los explantos cultivados (2 días) en amonio 1mM o KH_2PO_4 0.1mM, en presencia o ausencia de kinetina (10^{-4} M). La adición de nutrientes fue realizada en el agua (SW), en la arena (SND) o en ambas (SW-SND). Las barras son medias de 6 a 9 réplicas. Las líneas verticales son error estándar. Las mismas letras sobre las barras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos con y sin kinetina o tratamientos versus plantas control.

Factor	GH
Amonio	*
Nitrato	ns
Ácido glutámico	ns
KH_2PO_4	**
Gliceraldehido-3P	*
KH_2PO_4 amonio	**
Gliceraldehido-3P-amonio	ns
Porcentaje de varianza de GH explicado	76% para N 94% para N+P

Tabla 1. Resumen del análisis Anova y la significancia estadística de los factores y sus efectos sobre la variable GH (**, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$; ns, no significativo). N significa sólo adición de nitrógeno, N+P significa adición de fósforo después del amonio como mejor fuente de N.

El carbono fijado en la hoja fue traslocado rápidamente hacia el rizoma y las raíces (Tabla 2) tras el periodo de incubación.

mg	C h ⁻¹ mg ⁻¹ Chl a	mg C h ⁻¹ mg ⁻¹ FW
Hoja	0.185 ± 0.03 (30%)	0.55 ± 0.044 (14%)
Rizoma	0.26 ± 0.07 (43%)	1.26 ± 0.020 (34%)
Raíz	0.16 ± 0.04 (26%)	1.92 ± 0.015 (52%)

Tabla 2. Tasas y localización del carbono fijado después de 90 minutos de incubación en carbono radiactivo inorgánico (n=3). Los valores son medias ± error estándar. Los porcentajes de carbono total fijado en cada órgano están en paréntesis.

DISCUSIÓN

La consecución de una propagación exitosa depende en gran medida de la efectividad de los reguladores para, por un lado, inducir un patrón determinado de crecimiento y, por otro, propagar las plántulas que han sido producidas. En este trabajo, *C. nodosa* ha regenerado callo y/o hoja a partir de explantos apicales y axénicos, usando el tidiazurón, y respondido a otros reguladores con la elongación y regeneración de nuevas hojas. De todos ellos, el ácido giberélico indujo un mayor crecimiento en la hoja que el obtenido en el control a la vez que aumentó el porcentaje de explantos regenerados, mientras que el resto de citoquininas afectaron más al crecimiento de las hojas y en menor grado a la regeneración en comparación con el control (Figura 2). En otras fanerógamas como *Posidonia oceanica* y *Ruppia maritima*, la presencia de citoquininas también favoreció el crecimiento de brotes y del rizoma (Loques et ál., 1990; Koch & Durako, 1991), o en segmentos de rizoma obtenidos a partir de semillas de *Halophila decipiens* en los que la auxina aumentaba el crecimiento de brotes y la producción de ramas (Bird et ál., 1998). En *C. nodosa*, Terrados-Muñoz (1995) constata también los efectos del giberélico sobre el desarrollo de hojas en explantos separados a partir del rizoma.

Esta factibilidad para el establecimiento del cultivo *in vitro* de fanerógamas hace pensar que el punto de inflexión que hace fracasar la micropropagación radica en la emisión de hojas y enraizamiento. El hecho de que la plántula o el callo regenerado sean efímeros y nunca tenga un desarrollo posterior, o que la extensión de la hoja sea la única respuesta observada ahondan en esta segunda fase como la etapa clave en la propagación de las fanerógamas.

En esta línea, los experimentos realizados con fragmentos internodales (hoja, rizoma, raíz) han demostrado la importante y necesaria conexión existente entre estas tres partes. La primera evidencia, se presenta con los datos de traslocación de carbono inorgánico fijado (Tabla 2). Los resultados obtenidos indican que la hoja, la porción de rizoma y las raíces asociadas forman casi una "unidad fisiológica", donde el carbono fijado es rápidamente repartido dentro de la propia hoja, el rizoma y las raíces (50% en peso fresco). La segunda corroboración se pone de manifiesto con la forma de asimilación de los nutrientes (amonio y fosfato inorgánico, Tabla 1) e íntimamente dependiente de dónde se encuentran (Figura 3). De esta manera, los niveles de P de la planta disminuyen, a las 48 h, a menos que se incorpore al tejido sumergido o que exista kintina en el agua. Así pues, las partes sumergidas parecen ser esenciales en la asimilación del P, mientras que, tanto el tejido sumergido como el emergido son igual de eficientes en la asimilación del N.

En conclusión, se han establecido cultivos *in vitro* a partir de explantos apicales, los cuales respondieron a los tratamientos con sustancias reguladoras de crecimiento de tal forma que se obtuvo crecimiento inducido (i.e. regeneración de callos) o sostenido (i.e. extensión de la hoja). La posterior propagación de los brotes y los experimentos de fijación de car-

bono revelaron que la hoja, el rizoma y las raíces forman una unidad fisiológica, que trasloca rápidamente el carbono fijado y mantiene funciones diferenciadas en la asimilación de nutrientes, siendo la raíz esencial en la adquisición de P. Los resultados apuntan hacia la absoluta necesidad de obtener la planta anatómicamente completa antes de continuar con las siguientes etapas de propagación.

BIBLIOGRAFÍA

Agrawal, A., Mohan Ram, H.Y. (1995): *In vitro* germination and micropropagation of water chestnut (*Tropha sp.*) Aquat. Bot. 51, 135-146.

Bird, K.T., Plyler, D.P. and Kapraun, D.F. (1994): Marine Plant Tissue Culture in environmental biotechnology. Proceedings 3th International Marine Biotethnology Conference. Tromsø, Norway.

Bird, K.T., Brown, M.S., Henderson, T.T., O'Hara, C.E., Robbie, J.M. (1996): Culture studies of *Ruppia maritima* L. in bicarbonate and sucrose-based media. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 199, 153-164.

Bird, K.T., Johnson, J.R., Jewett-Smith, J. (1998): *In vitro* culture of the seagrass *Halophila decipiens*. Aquat. Bot. 60,377-387.

Box, G.E.P., Behnken, D.W. (1969): Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics 2, 455-457.

Dennison W.C., Orth R.J., Moore K.A., Stevenson J. C., Carter V., Kollar S., Bergstrom P.W. and Batiuk R.A. (1993): Assessing water quality with submersed aquatic vegetation. BioScience 43(2): 86-94.

Duarte C.M. (1995): Submerged aquatic vegetation in relation to different nutrient regime. Ophelia 41: 87-112.

Ellender R.D. (1991): Initiation of callus cultures and plantlet regenera-

Los resultados obtenidos indican que la hoja, la porción de rizoma y las raíces asociadas forman una "unidad fisiológica", que reparte rápidamente el carbono fijado y mantiene funciones diferenciadas en la asimilación de nutrientes, siendo la raíz esencial en la adquisición de P.

