

MICROPROPAGACION DE *LOTUS BERTHELOTII* MASF. (LEGUMINOSAE), UN ENDEMISMO CANARIO EN PELIGRO DE EXTINCION

CLARA I. ORTEGA GONZALEZ

Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" del Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria.

RESUMEN

En este trabajo se han obtenido plántulas de *Lotus berthelotii* Masf. estimulando primordios foliares, localizados en los ápices de ramas, mediante técnicas de cultivos "in vitro".

El proceso de estimulación de brotes se realizó en un medio básico Murashige & Skoog (1962) de sales minerales, con Biotina, Myo-inositol y suplementado con diversas combinaciones de Acido indol acético-Kinetina. Estos brotes fueron transferidos después de la quinta y sexta semana a un medio básico Murashige y Skoog (1962) de sales minerales con Biotina, Myo-inositol y suplementado con Acido indol butírico. Poniéndolos a enraizar al cabo de 5 semanas en un medio de White (1963) de sales minerales, suplementado con Acido indol acético.

SUMMARY

Plantlets of *Lotus berthelotii* Masf. have been obtained *in vitro* by the stimulation of leaf-primordia in excised stem apices.

In vitro cultivation was by means of a basic Murashige & Skoog medium of nutrients with Biotine and Myo-inositol supplemented with various combinations of indole -3 acetic acid and Kinetin.

The shoots produced were transferred after five or six weeks to a basic Murashige & Skoog medium of nutrients with Biotine and Myo-inositol and supplemented with indole butyric acid. After a further five weeks plantlets were rooted in a White medium of nutrients supplemented by Indole -3 acetic acid.

INTRODUCCION

Lotus berthelotii Masf. perteneciente a la sección *Heinekenia* Brand y a la familia Leguminosae, ha sido muy escasa desde su descubrimiento en 1881, citándose como localidades conocidas para ella, todas en la isla de Tenerife, las siguientes: La Orotava; Tamadaya sobre Arico; Sta. Ursula, Bco. del Pino (Ceballos y Ortuño, 1976). En los últimos años no se han encontrado ejemplares en las mismas, por lo que la especie fué considerada como extinta en su habitat natural. En la actualidad sólo se tiene conocimiento de algún ejemplar en una nueva localidad en la zona de Vilaflor (Tenerife).

La IUCN, recoge en el Libro Rojo de 1978 una primera lista de los endemismos más amenazados a nivel mundial, y les dá diferentes categorías dependiendo del grado de amenaza a que está sometido en estado natural. A *Lotus berthelotii* la clasifica como extinguida, usando esta categoría para aquellas especies de las que no se tiene conocimiento en estado silvestre.

Gracias al valor ornamental de la especie, planta colgante con flores llamativas color rojo escarlata y sus hojas filiformes recubiertas de pelos sedosos plateados, se ha conservado en cultivo en jardines de Canarias mediante propagación vegetativa por esqueje.

La fuerte autoincompatibilidad que presenta *L. berthelotii*, hace difícil la obtención de semillas especialmente con el material disponible en el Jardín Canario "Viera y Clavijo", ya que procede de un sólo clon. Bramwell (1981) estudió la biología reproductiva de *L. berthelotii* utilizando material del Jardín Canario y otro procedente de Zurich, que probablemente su origen sea de la colección de Canarias de Christ o Hillebrand (1880), realizando un cruzamiento artificial entre individuos de ambos clones, obteniendo semillas, pero sin llegar al estado de maduración al ser parasitadas por larvas de un pequeño curculiónido. Asimismo, se comprobó que todo el material procedente de Zurich, presentaba adaptaciones a las condiciones climáticas de invernadero, por lo que hacía imposible su supervivencia en su habitat original natural.

Las técnicas de cultivo de tejido "in vitro" juegan un papel importante como medida conservacionista de especies en peligro de extinción. Por ello en el Jardín Canario "Viera y Clavijo", se ha introducido esta técnica para propagar plantas autóctonas amenazadas y en especial aquellos casos en los que la producción en condiciones convencionales presenta dificultades como ocurre con la especie *L. berthelotii*. El cultivo de tejido tiene claras ventajas en la conservación genética para el mantenimiento de plantas vivas, ya que éstas pueden ser mantenidas en tubos test indefinidamente, transfiriendo cortes a un nuevo medio cada cierto tiempo. Estas ventajas son: el pequeño tamaño,

una cierta rapidez de multiplicación y ausencia de patógenos. Sin embargo, la aplicación de la técnica de cultivo de tejido "in vitro" presenta más dificultades a la hora de trabajar con plantas amenazadas. Junto a los problemas de la técnica se suma la dificultad de encontrar algún tipo de información sobre experiencias anteriores relacionadas con el tema. Además, es reconocida la dificultad que presenta trabajar en este campo con plantas de la familia Leguminosae (Zachary S. Wochok, 1981).

Mediante estas técnicas, nosotros hemos obtenido plántulas de *L. berthelotii*, a partir de zonas meristemáticas, debido a que los brotes de todas las Angiospermas y Gimnospermas, crecen en virtud de sus meristemas apicales. El meristemo apical es generalmente una cúpula de tejido localizada en las puntas del extremo de un renuevo y mide 0,1 mm. en diámetro y 0,25 a 0,3 mm. en longitud. El cultivo de meristemo dentro de las técnicas de cultivo de tejido "in vitro" presenta una serie de ventajas; rápida propagación de plantas, plantas genéticamente idénticas al dador patrón y plantas libres de patógenos.

MATERIAL Y METODOS

El material utilizado por nosotros en las técnicas de cultivo, fueron microesquejes de 10 a 15 mm. de longitud. Estos microesquejes consistían en zonas meristemáticas acompañadas de 6 a 7 pares de hojas, tomados de ramas terminales. La decisión de trabajar con material de 10 a 15 mm. de longitud frente a utilizar medidas de 0,3 mm. (meristemo propiamente dicho), presenta una serie de ventajas; el riesgo de dañar el material durante su manejo es mínimo, así como la rapidez a la hora de transferir o sembrar el material. Es sobradamente conocido que cuanto mayor es el tamaño del material, más grande es la probabilidad de llevar contaminante, pero esto se puede compensar alargando el tiempo de esterilización.

Los microesquejes fueron tomados a lo largo de todo el año, de pies de plantas adultas cultivadas en el Jardín Canario "Viera y Clavijo". Las muestras recogidas medían entre 30 y 40 mm., se lavaron con agua corriente y se les retiró la parte inferior a cada una de ellas, midiendo el material entre 20 y 30 mm. Seguidamente se les pulverizó con alcohol de 70% y se distribuyeron en distintas placas de Petri.

El proceso de desinfección superficial del material vegetal se llevó a cabo dentro de una Cabina de Flujo Laminar. Se sumergieron primero en alcohol de 70% unos segundos y seguidamente se pasó a soluciones de Hipoclorito sódico.

co a distintas concentraciones y distintos tiempos; 30 minutos al 1% (10% solución comercial) y posteriormente 20 minutos al 0,5% (5% solución comercial) (Yeoman and Macleod, 1977). Finalizada la inmersión en Hipoclorito sódico se lavó 3 veces con agua destilada y esterilizada, para eliminar los residuos del agente desinfectante y por último se eliminó la parte inferior así como las hojas más externas que protegían al tejido meristemático, quedando el material reducido de 10 a 15 mm. de longitud, con 7 u 8 pares de hojas.

Los microesquejes fueron transferidos a un medio sólido Murashige & Skoog (1962) de sales inorgánicas, conteniendo por litro: 100 mg. Myo-inositol, 0,1 mg. Biotina y suplementado con diferentes combinaciones de Acido indol acético y Kinetina (Figura 1) y 3% Sacarosa, 1% Agar, pH a 5,7 ajustado con C1H 1N y/o KOH 1N. La esterilización se realizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La siembra se efectuó en tubos de 25 × 150 m., conteniendo 15 ml. de medio y tomando 20 muestras por tratamiento, tapándolos con Bellco (KAP-UTS). La incubación se llevó a cabo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 25°C de temperatura.

FIGURA 1: Cinco tratamientos formados con un medio básico de Murashige & Skoog (1962) de sales inorgánicas, 100 mg/l Myo-inositol, 0,1 mg/l Biotina, con diferentes combinaciones de Acido indol acético y Kinetina. Para simplificar se ha puesto sólo Murashige & Skoog, pero implica que lleva Myo-inositol y Biotina en cada tratamiento.

- 1° Tratamiento: Murashige & Skoog
- 2° Tratamiento: Murashige & Skoog + Kinetina (2 mg/l)
- 3° Tratamiento: Murashige & Skoog + Kinetina (2 mg/l) + Acido indol acético (20 µg/l)
- 4° Tratamiento: Murashige & Skoog + Kinetina (1 mg/l) + Acido indol acético (50 µg/l)
- 5° Tratamiento: Murashige & Skoog + Kinetina (1 mg/l).

Después de la quinta y sexta semana a la siembra, los brotes se repicaron a un medio básico Murashige & Skoog (1962) de sales minerales, conteniendo por litro: 100 mg. Myo-inositol, 0,1 mg. Biotina y 0,1 mg. Acido indol butírico. Siendo la cantidad de Sacarosa y Agar, así como la valoración de pH y el proceso de esterilización, en iguales condiciones que en el medio inicial. Fué después de la quinta semana de esta siembra, el paso de los brotes a un medio de enraizamiento, White (1913) de sales minerales, suplementado con 10 mg/l de Acido indol acético, con 2% Sacarosa, 0,7% Agar y el pH a 5,5 ajustado con CLH 1N y/o KOH 1N y esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

RESULTADOS

Para la estimulación de brotes se realizaron siembras en cinco tratamientos distintos, considerando un tratamiento como test o patrón en el que no había presencia de hormonas (Figura 2).

FIGURA 2: Resultados de los cinco tratamientos:

Tratamiento	Nº de tubos sembrados	Nº de tubos contaminados	Nº de tubos con formación de brotes entre la 5ª y la 6ª semana a la siembra	Tipo de crecimiento
Murashige & Skoog	20	5	--	--
Murashige & Skoog + Kinetina (2 mg/l)	20	6	14	rápido
Murashige & Skoog + Kinetina (2 mg/l) + Acido indol acético (20 µg/l)	20	4	6	lento
Murashige & Skoog + Kinetina (1 mg/l) + Acido indol acético (50 µg/l)	20	7	3	lento
Murashige & Skoog + Kinetina (1 mg/l)	20	4	7	lento

Se observaron brotes en todos los tratamientos con presencia de alguna hormona, es decir con Acido indol acético y/o Kinetina. Pero hay que detallar que en presencia de ambos estimuladores del crecimiento, la presencia de brotes no era uniforme en todos los tubos y pudiera ser que la presencia de Acido indol acético inhiba a la Kinetina, ya que en algunos se apreciaba su formación y en otros no. Por el contrario, en los tratamientos donde sólo había Kinetina, se observaron mejores resultados; con concentraciones de 1 mg/l los brotes aparecían en mayor cantidad que en aquellos donde coexistían ambos estimuladores y con concentraciones de 2 mg/l había un mayor número por tubos en relación a los medios cuyas concentraciones eran de 1 mg/l.

Asímismo, se comprobó que los brotes procedentes del tratamiento con concentraciones de 2 mg/l de Kinetina, presentaban un crecimiento más rápido cuando fueron repicados.

Todos los brotes eran capaces de formar raíces en el medio de White (1963), independiente del tratamiento anterior recibido.

Los microesquejes sembrados en los tubos test del medio patrón, en ausencia de hormonas, no tuvieron estímulos para la formación de brotes.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El cultivo "in vitro" de *Lotus berthelotii* queda demostrado que es una técnica eficaz para conseguir la propagación de esta planta amenazada, siendo el medio de cultivo más adecuado hasta el momento, con concentraciones de 2 mg/l de Kinetina, en un medio básico de Murashige & Skoog (1962).

Sería interesante cultivar individuos de *L. berthelotii* procedentes de un clon distinto al del Jardín Canario "Viera y Clavijo", e intentar volver a realizar un cruzamiento artificial con individuos cultivados "in vitro", de ambos clones, para mantener el máximo la diversidad genética y con la consiguiente obtención de un stock de semillas que aseguraría la reproducción sexual y distribución a sus habitats naturales. En el caso de individuos procedentes del clon de Zurich, podría ser esperanzador que el hecho de mantenerlos durante meses en condiciones controladas de temperatura y luz pudiese ser efectivo para su adaptación a las condiciones climáticas de Canarias.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado dentro del Convenio entre el Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria y el ICONA en materia científica y educativa.

BIBLIOGRAFIA

- BRAMWELL, D. (1981). Conservation-orientated research in local botanical gardens. *Bot. Jahrb. Syst.* 102, 1-4, 125-132.
- DOODS, J.H. & ROBERTS, L.W. (1982). *Experiments in Plant Tissue Culture*. First published 1982. Cambridge University Press. 178 pp.
- LUCAS, G. & SYNGE, H. (1978). *The IUCN Plant Red Data Book*. International Union for conservation of nature and natural resources. IUCN. Morges, Switzerland, 1978. 540 pp.
- WHITE, P.R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9, 585-600.
- WOCHOK, Z.S. (1981). The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biological Conservation* 20 (1981) 83-89.
- YEOMAN, M.M. & MACLEOD, A.J. (1977). Tissue (Callus) Cultures-Techniques. In *Plant Tissue and Cell Culture*. 31-59 pp. (2nd Edition. H.E. Street, ed). Blackwell Scientific Publications.