

# Incidencia de la concentración de reguladores vegetales sobre la formación de vástagos *in vitro* en tres explantes de lino (*Linum usitatissimum* L.)

Cointry, E.L., L.A. Mroginski y L.A. Picardi

## RESUMEN

Para seleccionar la combinación óptima de reguladores vegetales que promueven la neoformación de vástagos en segmentos internodales de tallo, cotiledones y hojas de lino se evaluaron sobre el medio basal MS cuatro niveles de AIA, ANA y 2,4-D (0,01; 0,1; 1,0 y 3,0 mg l<sup>-1</sup>) solos y en combinación con los mismos cuatro niveles de BAP. Se analizó el porcentaje de explantes con vástagos y el NV. Se demostró un requerimiento en reguladores vegetales diferencial para la regeneración de los tres explantes dado que para segmentos internodales de tallo la combinación más adecuada fue MS + 1 mg l<sup>-1</sup> BAP y para cotiledones y hojas MS + 1 mg l<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg l<sup>-1</sup> ANA. Los valores fueron 100 % de regeneración con un NV de 7,7 para segmentos internodales de tallo y de 23 y 33 % de regeneración con un NV de 3 y 5 para cotiledones y hojas respectivamente. El comportamiento de los diferentes cultivares ensayados reveló que no existen diferencias significativas entre sus capacidades regenerativas.

**Palabras clave:** *Linum usitatissimum*, micropropagación, lino.

**Abreviaturas:** ANA: ácido naftalen acético; AIA: ácido indol acético; 2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético; BAP: N6-bencilaminopurina; MS: Medio Murashige y Skoog (1962); NV: número promedio de vástagos.

Cointry, E.L., L.A. Mroginski y L.A. Picardi, 1993. Effect of vegetable growth hormone on *in vitro* shoot-forming from three explants of flax. *Agriscientia*, X : 39-43.

## SUMMARY

The regenerations of shoots from cotyledons, segments of shoot and leaf explants of *Linum usitatissimum* L. were evaluated *in vitro* on Murashige and Skoog's medium supplemented with a single substances at different concentrations in a range of mg l<sup>-1</sup> 0.01; 0.1; 1.0 and 3.0 of IAA, NAA and 2,4-D or combinations with BAP same concentration. The percentage of explants with shoots and the average

---

Fecha de recepción: 28/12/92; fecha de aceptación: 23/12/93.

number of shoots (NV) were analyzed. The optimal combination of growth substances for bud regeneration on segments of shoot explants was 1 mg l<sup>-1</sup> BAP and 1 mg l<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA for cotyledons and leaf explants. The 100 % of regenerations and a NV = 7.7 from segments of shoot were induce, whereas 23 % and 33 % with a NV = 3 and 5 respectively, was achieved from cotyledons and leaf explants. No differences were found in the regeneration capacity of explants from different cultivars.

**Key words:** *Linum usitatissimum*, micropropagation, flax.

E.L. Cointry, y L.A. Picardi, Cátedra de Genética. Fac. Ciencias Agrarias. U.N. de Rosario. C.C. 14. 2123 Zavalle (Santa Fe), Argentina. L.A. Mroginski, Instituto de Botánica del Nordeste. U.N.NE., Corrientes, Argentina.

## INTRODUCCIÓN

Diferentes explantes de lino fueron utilizados en trabajos destinados a determinar la composición de los medios de cultivo para lograr una alta tasa de regeneración de plantas. Ibrahim (1971), con cotiledones de lino, mostró la conveniencia del empleo de la solución nutritiva de Murashige y Skoog (1962) y la ineffectividad de la cinetina para promover la regeneración de plantas. En cambio, Murray *et al.* (1977), demostraron la efectividad de la benciladenina para la obtención de plantas mediante el cultivo de hipocótilos. Similares resultados fueron informados por Barakat y Cocking (1983) —trabajando con protoplastos— y por McHughen y Swartz (1984), con el cultivo de segmentos de plántulas. Asimismo Zhan *et al.* (1989), en *Linum marginale*, demostraron que la benciladenina en niveles superiores a 5 mg l<sup>-1</sup> inhibe la formación de yemas a partir de cotiledones y que este explante es menos eficiente que los hipocótilos. Por su parte Millan *et al.* (1992) encontraron que la diferenciación puede ser afectada por la fuente carbonada utilizada en el medio de cultivo.

El objetivo de este trabajo consistió en comparar la capacidad de neoformación de vástagos a partir de cotiledones, hojas y segmentos internodales de tallos de cinco cultivares de lino (*Linum usitatissimum* L.) en medios con diferentes sustancias reguladoras del crecimiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como material experimental se utilizaron los cultivares de *Linum usitatissimum* (2n = 30): Areco INTA, H 1316 F6-6/846 y H 1763 F4-3 originarios de la E.E.A. INTA Pergamino y los cultivares australianos Hazeldean y Glenelg.

Para evaluar las combinaciones de reguladores vegetales se utilizó como material donante de explantes al cv. H 1316 F6-6/84. Las semillas se sembraron en macetas de 15 cm. de diámetro y fueron incubadas en un cuarto climatizado con un fotoperíodo de

16 hs. y una temperatura de 25 ± 2° C con una intensidad lumínica de 50 uE m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. A los siete días de germinadas se extrajeron los cotiledones para su cultivo *in vitro*; así también cuando las plantas alcanzaron 10 cm. de altura se extrajeron las cinco hojas superiores expandidas seccionando los tallos (desprovistos de yemas axilares) en porciones internodales de 1 cm. La desinfección de los explantes se efectuó por inmersión en etanol 70° durante 15 segundos y por cinco minutos en ClONa al 1 % de cloro activo con posteriores lavados en agua bidestilada estéril. Se empleó el medio basal de Murashige y Skoog (1962) (MS) adicionado de los ácidos indolacético (AIA), naftalenacético (ANA) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ensayando cada uno en cuatro concentraciones (0,01; 0,1; 1.0 y 3.0 mg l<sup>-1</sup>) solos y en combinaciones con los mismos cuatro niveles de benciladenina (BAP). Como testigo se utilizó el medio basal sin reguladores. Los medios se solidificaron con 0,9 % PV de agar ajustándose el pH a 5,8 con NaOH 1N. La siembra se efectuó en tubos de cultivo de 22 x 110 mm. La incubación se efectuó en un cuarto climatizado a 25 ± 2° C y un fotoperíodo de 16 horas de luz con una intensidad lumínica de 50 uE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

El diseño experimental fue un DBCA con 8 repeticiones efectuándose dos veces, en el tiempo, el mismo experimento.

Para evaluar la eficiencia de las diferentes formulaciones se determinó tanto el porcentaje de explantes que desarrollaron vástagos como el número promedio de vástagos por explante. Se consideró como tal al tallo que alcanzaba como mínimo 1 cm. de altura. Para el análisis de la primer variable se utilizó la "G" de Sokal mientras que para la segunda la prueba de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1976).

Una vez seleccionado el medio adecuado para cada explante se procedió a la siembra de los mismos en un DBCA con 10 repeticiones por cultivar y

**Tabla 1.** Porcentaje de segmentos de tallo que forman vástagos en el cv.H 1316 F6-6/84 por combinación de reguladores vegetales.

Auxinas (mg l <sup>-1</sup> )	BAP (mg l <sup>-1</sup> )														
	0			0,01			0,1			1,00			3,00		
	ANA	AIA	2,4-D	ANA	AIA	2,4-D	ANA	AIA	2,4-D	ANA	AIA	2,4-D	ANA	AIA	2,4-D
0,00	0			62,5			75,0			100			0		
0,01	62,5	62,5	75	62,5	37,5	100	100	62,5	62,5	100	25	0	0	87,5	75
0,10	100	0	100	0	37,5	0	10	75	100	100	75	75	62,5	75	0
1,00	0	87,5	100	0	37,5	0	0	87,5	0	25	37,5	0	0	0	0
3,00	0	25	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0

explante efectuándose también dos repeticiones en el tiempo.

Como estimador de la capacidad de regeneración se utilizó el número promedio de vástagos. Para el análisis se utilizó un ANOVA a un criterio de clasificación.

**RESULTADOS**

El 54,7 % de las combinaciones de las formulaciones efectuadas indujeron la neoformación de vástagos a partir de segmentos de tallos del cv. H 1316 F6-6/84 sin previa formación de callos. En la Tabla 1 se muestran el porcentaje de explantes con vástagos por combinación de reguladores vegetales. El análisis de la primer variable demostró una interacción altamente significativa entre el tipo y el nivel de auxina para cada nivel de BAP (G = 41,50; G = 25,68; G = 64,23; G = 24,64 y G = 27,37; p < 0,01 para los niveles de BAP 0; 0,01; 0,1; 1,0 y 3,0 mg l<sup>-1</sup> respectivamente). Es-

to implica que para cada nivel de BAP existe una o más combinaciones adecuadas lo que dificulta la selección de una combinación óptima.

El número promedio de vástagos por combinación de reguladores vegetales manifestó diferencias altamente significativas (H = 33,74; p < 0,01) demostrando un comportamiento similar las combinaciones de BAP 1 mg l<sup>-1</sup>; BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup> + ANA 0,01 mg l<sup>-1</sup>; BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup> + 2,4-D 0,1 mg l<sup>-1</sup> y BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup> + AIA 1 mg l<sup>-1</sup> (Figura 1).

Sobre la base de las dos variables se seleccionó como medio adecuado para evaluar la capacidad regenerativa de los distintos cultivares el constituido por BAP 1 mg l<sup>-1</sup> ya que promueve un 100 % de regeneración con un elevado promedio de vástagos. El medio MS sin reguladores no indujo la regeneración de vástagos. El análisis de las formulaciones con sólo BAP demuestra que un incremento de concentración hasta 1 mg l<sup>-1</sup> aumenta el porcentaje de explantes con vástagos, como también el número promedio aunque se anula su efecto con concentraciones superiores. En la figura 1 se observa que la adición de auxinas provoca una disminución del nivel de BAP necesario para una óptima neoformación. El ANA y el 2,4-D inhiben la formación de vástagos con los niveles más elevados favoreciendo la formación de raíces a diferencia del AIA que aún con 3 mg l<sup>-1</sup> favorece la caulogénesis.

**Tabla 2.** Efecto de la N6-Bencilaminopurina (BAP), del ácido naftalen acético (ANA) y del ácido indol acético (AIA) sobre la regeneración y el número promedio de vástagos por explante (NV) en el cv. H 1316 F6-6/84.

Medio (reguladores en mg l <sup>-1</sup> )	Explante	% de explantes con vástagos	NV
MS + BAP 1 + ANA 0,01	Hoja	12,0	3,0
MS + BAP 1 + ANA 0,10	Hoja	23,0	3,0
MS + BAP 1 + AIA 0,01	Cotiledón	20,0	4,6
MS + BAP 1 + ANA 0,10	Cotiledón	33,0	5,0
MS + BAP 1 + AIA 1,00	Cotiledón	17,2	4,2

A diferencia de los segmentos internodales de tallo, sólo dos combinaciones de reguladores vegetales promovieron la regeneración de vástagos previa formación de callos a partir de cotiledones y tres lo hicieron a partir de hojas (Tabla 2). Sólo la presencia de auxinas y de citocininas promueven la regeneración, siendo mucho más limitadas las concentraciones que inducen la caulogénesis. A pesar de la escasa regeneración, la combinación más apta

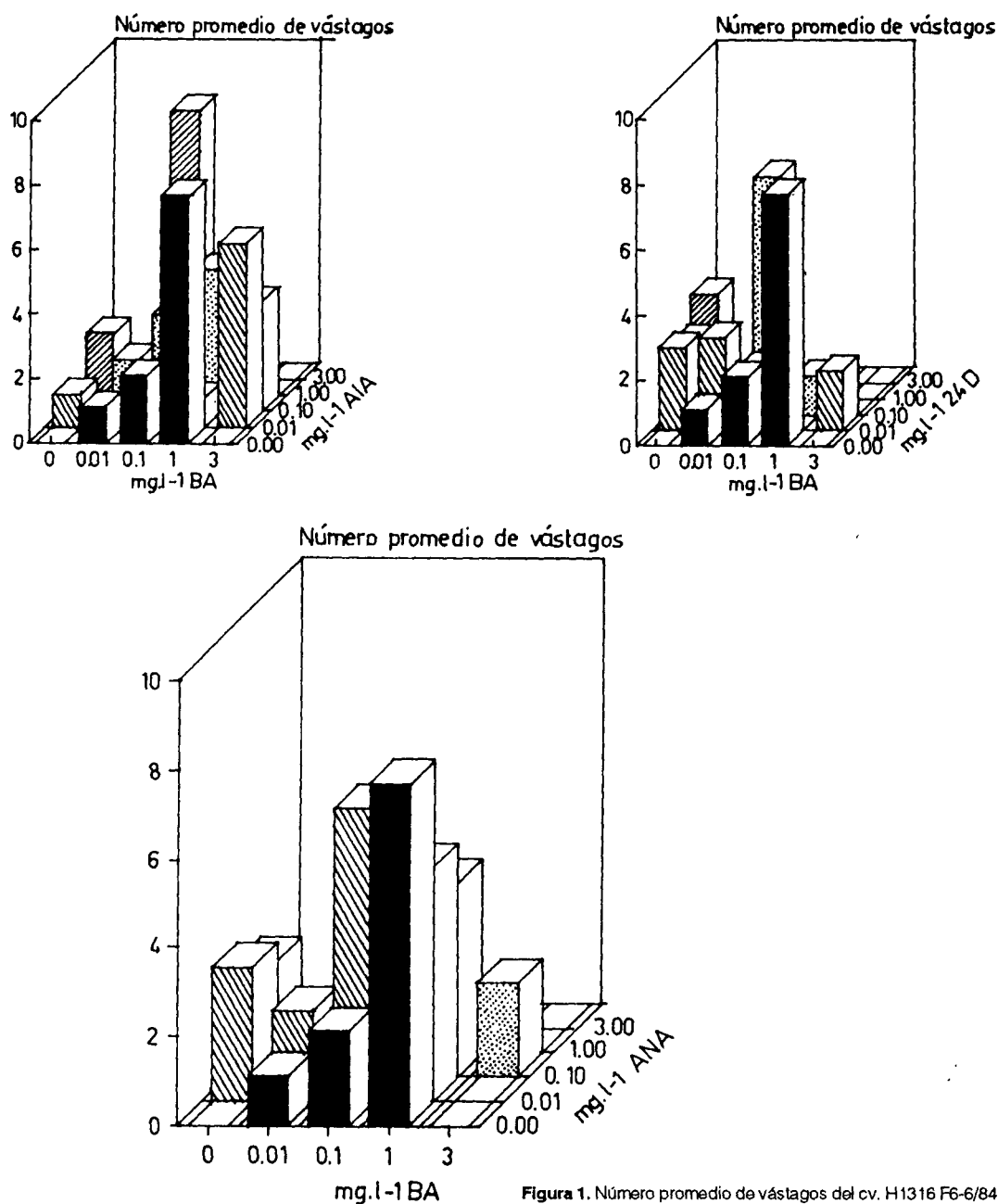


Figura 1. Número promedio de vástagos del cv. H1316 F6-6/84 por combinación de reguladores vegetales.

para evaluar el comportamiento de los diferentes genotipos fue BAP 1 mg l<sup>-1</sup> + ANA 0,1 mg l<sup>-1</sup>.

En la Tabla 3 se presenta el número promedio de vástagos y el porcentaje de regeneración de los tres explantes obtenidos de diferentes cultivares. No se detectaron diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas aunque existe un efecto muy marcado del explante en su capacidad regenerativa.

## DISCUSIÓN

De los datos presentados se infiere que la neoformación de vástagos es posible cuando se emplean como explantes segmentos internodales de tallos. La regeneración a partir de hojas y cotiledones es errática. Estos explantes requieren una combinación hormonal superior a los segmentos de tallos a pesar

**Tabla 3.** Cuadro comparativo del porcentaje de regeneración (R) y del número promedio de vástagos (NV) producidos sobre el medio MS + 1 mg l<sup>-1</sup> para tallos y MS + BAP 1 mg l<sup>-1</sup> + ANA 0,10 mg l<sup>-1</sup> para cotiledones y hojas en diferentes cultivares de lino.

Cultivar	Explante					
	Tallo		Hoja		Cotiledón	
	NV	R	NV	R	NV	R
Hazeldean	4,29	100	0	0	0	0
Glenelg	5,64	100	0	0	0	0
H 1763 F4-3	5,00	100	0	0	0	0
H 1316 F6-6/84	5,64	100	2,0	10,0	0	0
Areco INTA	3,72	100	0	0	0	0

de poseer la misma constitución genética implicando que la especialización del tejido durante el desarrollo provocaría cambios en las demandas celulares para la expresión de su potencialidad *in vitro*. Si bien los contenidos hormonales endógenos pueden ser diferentes entre explantes las variaciones en las características regenerativas son a veces atribuibles a diferencias en la edad fisiológica y al grado de diferenciación de las células constituyentes (Murashige, 1974). Esto implica que en cada tejido se expresan o activan diferentes sistemas genéticos.

Con respecto a las combinaciones hormonales el nivel máximo de regeneración de vástagos a partir de segmentos internodales de tallo se obtiene con niveles de 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP demostrando que los niveles endógenos de citocininas no alcanzan a cubrir los requerimientos necesarios para la neoformación de vástagos. Superado el nivel de 1 mg l<sup>-1</sup> se inhibe dicha formación. La adición de auxinas no incrementa dicho valor. Esto implica que las auxinas exógenas no intervienen en la neoformación de vástagos o bien que los niveles endógenos son suficientes para provocar dicho efecto. En todos los casos la adición de auxinas hace que el requerimiento de BAP para promover la máxima regeneración sea inferior (0,1 mg l<sup>-1</sup>). La concentración de auxinas de-

pende del tipo utilizado siendo el ANA el más efectivo y el AIA. El requerir una mayor concentración es debido a que puede ser desactivado por la oxidasa ácido indol acético como fue demostrado por Hare en 1964. Esto, junto al hecho de que las auxinas por sí solas promueven la regeneración, sugeriría que ambos reguladores vegetales están implicados en las mismas vías metabólicas.

Con respecto al comportamiento genotípico se demostró que los cultivares tienen la misma capacidad de regeneración independientemente de su origen genético lo que hace que sea una técnica extrapolable a los distintos materiales cultivados que constituyen las colecciones.

### BIBLIOGRAFÍA

Barakat, M.M. and E.C. Cocking, 1983. Plant regeneration \* from protoplast derived tissues of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Report* 2 : 314-317.

Hare, R.C., 1964. Indoleacetic oxidase *Bot. Rev.* 30:129-165

Ibrahim, R.K., 1971. Media for growth of flax tissue culture. *Can. J. Bot.* 49 : 295-298.

McHughen, A. and M. Swartz, 1984. A tissue culture derived salt-tolerant line of flax (*Linum usitatissimum* L.) *Jour. Plant. Physiol.* 117 : 109-117.

Millan, S, D. Davidson and W Powell, 1992. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis *in vitro*: the effect of different carbohydrates. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28 : 163-166

Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-498.

Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol* 25:135-166

Murray, B.E., R.S. Handside and W A Kaller, 1977 *In vitro* regeneration of shoot on stem explants of haploid and diploid flax (*Linum usitatissimum*). *Can J Genet Cytol.* 19 : 177-186.

Sokal, R.R. and F.S. Rohlf, 1967. *Biometry* W.H Freeman (Ed.). San Francisco. USA.

Zhan, X-c, D.A. Jones and A. Kerr, 1989. *In vitro* plantlet formation in *Linum marginale* from Cotyledons, Hypocotyls, Leaves, Roots and Protoplasts. *Aust J. Plant Physiol.* 16 : 315-320.