

E. García, P. Lorente, J.A. Marín, P. Andreu y A. Arbeloa

**FACTORES QUE AFECTAN A LA NECROSIS APICAL DE BROTES
DE *PISTACIA VERA* L. CULTIVADOS IN VITRO**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **107** N.º 4 (315-323), 2011

Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados in vitro

E. García*, P. Lorente, J.A. Marín, P. Andreu y A. Arbeloa

* Estación Experimental de Aula Dei-CSIC. Avda. Montañana 1005. 50059 Zaragoza. España.
E-mail: egarcia@eead.csic.es

Resumen

La necrosis apical aparece de forma habitual durante el cultivo in vitro de plantas leñosas y ha sido descrita en *Pistacia vera* desde los inicios de su cultivo in vitro. Es un problema complejo, ya que no se ha podido determinar su causa de forma definitiva a pesar de los numerosos trabajos realizados y limita enormemente su cultivo in vitro, por lo que la búsqueda de condiciones que controlen su aparición es de gran interés. En este trabajo se estudia la presencia de necrosis apical en diferentes medios de cultivo y el efecto de diferentes factores (adición de calcio, enfriamiento basal, número de brotes por frasco o frascos ventilados de mayor volumen) en la necrosis apical de brotes de pistacho in vitro. El medio DKW disminuye la incidencia de necrosis apical en comparación con los medios MS o WPM, posiblemente debido a que la concentración de calcio en el medio DKW es 3 veces superior que en los otros medios. Esto ha podido ocasionar la falta de efecto de la adición de calcio al medio DKW, en forma de gluconato de calcio, en la necrosis apical y en otros parámetros estudiados: porte del brote, tasa de multiplicación o número de entrenudos. Sin embargo, tanto el enfriamiento basal, o el menor número de brotes por frasco, como el uso de frascos ventilados y de mayor volumen, han disminuido la necrosis apical y mejorado el porte de forma significativa respecto al control, aunque no se encontraron diferencias entre ellos. Estos resultados se discuten en términos de que una mayor cantidad de medio de cultivo por brote y el aumento de la transpiración y el transporte de nutrientes pueden tener un efecto beneficioso en el cultivo in vitro del pistacho.

Palabras clave: Pistacho, gluconato de calcio, enfriamiento basal, número de brotes, ventilación.

Summary

Factors affecting shoot tip necrosis of *Pistacia vera* L. shoots cultured in vitro

Shoot tip necrosis is a common problem during in vitro culture of woody plants and was described in *Pistacia vera* right from the start of its culture. It is a complex problem whose cause could not be found yet, in spite of the numerous attempts already made, and limits to a great extent its tissue culture. In this work, pistachio shoot tip necrosis is studied in three different culture media, as well as the effect of different factors (Ca-gluconate, bottom cooling, shoot number or aeration) on shoot tip necrosis. DKW medium performed better than MS or WPM media, possibly due to its greater Ca concentration (up to 3 times more). This can be the cause of the lack of effect of Ca additions in the form of Ca-gluconate to DKW medium on shoot tip necrosis and on other parameters: shoot quality, multiplication rate or number of internodes. However, any of these factors: bottom cooling, shoot number per flask, or the use of vented jars with a bigger volume, had improved shoot tip necrosis impact and shoot quality in a significant way related to the control, although no significant differences among them were found. The results are discussed in terms of the beneficial effect on pistachio tissue culture of both higher quantities of medium per shoot and an increase of transpiration and nutrient transport through the shoot.

Key words: Pistachio, Ca-gluconate, bottom cooling, shoot number, aeration.

Introducción

La necrosis apical aparece de forma habitual durante el cultivo in vitro de plantas leñosas (Bairu *et al.*, 2009) y ha sido descrita en *Pistacia vera* desde 1985 (Barghchi y Alderson, 1985). A pesar de existir diferentes hipótesis sobre las causas que provocan la necrosis apical, no se ha podido determinar su origen de forma definitiva (Bairu *et al.*, 2009), lo que indica la complejidad del problema. En pistacho, la necrosis apical limita enormemente su cultivo in vitro y sus aplicaciones para su multiplicación y conservación, obligando a subcultivos frecuentes, por lo que la búsqueda de condiciones que limiten o controlen su aparición es de gran interés.

La necrosis apical se ha relacionado con numerosos factores entre ellos el calcio, para el que existen múltiples referencias bibliográficas donde el aumento de su concentración en el medio de cultivo alivia la incidencia de la necrosis apical de numerosas especies, incluida el pistacho (Barghchi y Alderson, 1996). Otro factor que se ha relacionado es el tipo de medio y la concentración de sus componentes, con resultados contradictorios, de manera que Bairu *et al.* (2009) concluyen que es la disponibilidad de los elementos del medio y no su concentración en el mismo lo que es importante. La ventilación de los cultivos, relacionada con la transpiración de los brotes, actuaría en este contexto de dos maneras, bien aumentando el flujo de nutrientes hacia la parte superior del brote, o bien evitando la acumulación en el frasco de cultivo de gases y compuestos volátiles que pueden afectar al brote, como el CO₂ o el etileno (De Proft *et al.*, 1985; Podwyszynska y Goszczynska, 1998). Otro factor entre los relacionados con la necrosis apical es la frecuencia de subcultivos (Jain *et al.*, 2009), que proporciona los nutrientes necesarios a los brotes evitando su agotamiento y favorece la eliminación de compuestos exudados por los brotes con una posible acción nociva.

En este trabajo se describe la incidencia desigual de la necrosis apical en diferentes medios de cultivo durante la tercera semana de cultivo, y se estudia el efecto de diferentes factores en la necrosis apical de brotes de pistacho cultivado in vitro.

Materiales y métodos

Micropropagación de *P. vera*

Brotes de *P. vera* cultivados in vitro durante más de dos años se subcultivaron en distintos medios de cultivo para su comparación: DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), MS (Murashige y Skoog, 1962) y WPM (Lloyd y McCown, 1980), añadiendo 0.5 µM IBA, 5 µM BA, 30 g l⁻¹ de sacarosa, y 7 g l⁻¹ de agar (Difco Bacto-agar) según el método descrito por García *et al.* (2010). Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16 h con luz blanca proporcionada por fluorescentes "cool-white" y una intensidad de 35 µmol m⁻² s⁻¹ y temperatura de 24°C y se subcultivaron cada tres semanas. Se compararon los diferentes medios de cultivo atendiendo a: necrosis apical (%), número de entrenudos por brote y tasa de multiplicación (número de brotes a partir de un brote), a las 3 semanas del subcultivo. Se analizaron 56 brotes por tratamiento y se realizaron dos repeticiones. Los datos fueron analizados, según su distribución, con diferentes pruebas estadísticas: test de Kruskal-Wallis (número de entrenudos por brote y número de brotes por brote o tasa de multiplicación) y el test de proporciones "prop. test" (necrosis apical). Se utilizó el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2008).

Necrosis apical

Se han usado para este trabajo brotes de *P. vera* cultivados in vitro durante más de dos

años. Los brotes se multiplicaron en una cámara de cultivo en condiciones similares a las descritas anteriormente. Los brotes se subcultivaron cada 3 semanas en un medio DKW modificado con 0.01 g l^{-1} de ácido ascórbico (antioxidante).

Para estudiar el efecto de diferentes factores en la necrosis apical de los brotes, se aumentó la duración entre subcultivos a 6 semanas, ya que a partir de la tercera semana aumenta la aparición de necrosis apical. Se estudiaron 4 tratamientos comparados con el control, en el que se utilizaron frascos de cultivo de vidrio de 100 ml de volumen (Sigma, St. Louis, MO, USA) con tapas Magenta B-cap (Sigma) en los que se colocaron 7 brotes por frasco y 30 ml de medio de cultivo DKW modificado como se ha descrito anteriormente. Para evaluar el posible efecto del aumento de la concentración de calcio se añadió al medio gluconato de calcio (3 mM) en las mismas condiciones del control. Igualmente se estudió el efecto del enfriamiento basal; se creó un gradiente de temperatura creciente entre el medio de cultivo y el ambiente, lo que favorece la transpiración y el transporte de nutrientes. Los frascos de cultivo se colocaron en una superficie refrigerada, a 6°C por debajo de la temperatura ambiente de la cámara de cultivo, manteniendo las demás condiciones como en el control. Se estudió, además, el efecto del tipo de frasco de cultivo y la ventilación comparando el control con un frasco de polipropileno (Sigma) de mayor volumen (700 ml) con tapas provistas de una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro que permite el intercambio de gases, pero no la entrada de microorganismos, a los que se añadieron 100 ml de medio de cultivo y se colocaron 12 brotes por frasco. Por último, se estudió el efecto de la reducción del número de brotes por frasco: 5 brotes en lugar de los 7 brotes del control, de manera que cada brote tuviera una mayor cantidad de medio

de cultivo disponible, manteniendo las demás condiciones como en el control.

Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento, excepto en el frasco de mayor volumen, que se realizaron 3, siendo el número inicial de brotes 35 (control, gluconato de calcio, enfriamiento basal), 36 (frasco de cultivo) o 25 (número de brotes). Se evaluaron diferentes parámetros en un número variable de brotes que dependió de la tasa de multiplicación durante el periodo de cultivo en cada tratamiento: control (88 brotes); gluconato de calcio (70 brotes); enfriamiento basal (75 brotes); frasco de cultivo (120 brotes) y número de brotes (59 brotes). Después de 6 semanas de cultivo se evaluaron diferentes parámetros: 1) la aparición de necrosis apical; 2) el porte del brote, asignando a cada brote una categoría: "Malo", si la planta presentaba necrosis apical y además presentaba un aspecto muy deteriorado, "Regular", si la planta presentaba los ápices amarillentos y "Bueno", si la planta presentaba crecimiento activo y sin síntomas de necrosis; 3) el número de entrenudos por brote y 4) la tasa de multiplicación durante el periodo de cultivo (número de brotes al final del periodo de cultivo por brote inicial). Los datos se analizaron según su distribución: el efecto de los diferentes tratamientos sobre la necrosis apical se analizó mediante la regresión logística, según un modelo lineal con errores binomiales, para obtener tablas de 'deviancia' que son análogas a las del análisis de varianza, utilizando la transformación "logit link function" a las probabilidades de los datos ($\text{logit } p = [\ln(p/(1-p))]$). El porte del brote se estudió mediante el análisis de tablas de contingencia utilizando el test de la Chi cuadrado. El número de entrenudos se analizó mediante un análisis de la varianza de una vía. Se utilizó el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2008).

Resultados y discusión

La necrosis apical de brotes de *P. vera* cultivados in vitro ha estado influida de forma muy significativa ($p < 0.001$) por el medio de cultivo utilizado (Figura 1). El medio DKW ha mostrado la menor incidencia de necrosis apical, con un número medio de entrenudos superior a 6 y manteniendo una tasa de multiplicación de 2.5 brotes por brote en cada subcultivo, inferior a la tasa del medio WPM (3.5 brotes por brote), que presentaba sin embargo una proporción de brotes con necrosis

apical superior al doble que el DKW (60%) y un menor número medio de entrenudos por brote (5), siendo estas diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). Por otra parte, el medio MS muestra una posición intermedia en el porcentaje de ápices necróticos, pero con la menor tasa de multiplicación (Figura 2).

Los medios de cultivo comparados difieren notablemente en su composición mineral. Dentro de los elementos minerales que más se relacionan con la presencia de necrosis apical se encuentran el boro y el calcio (Barghchi y

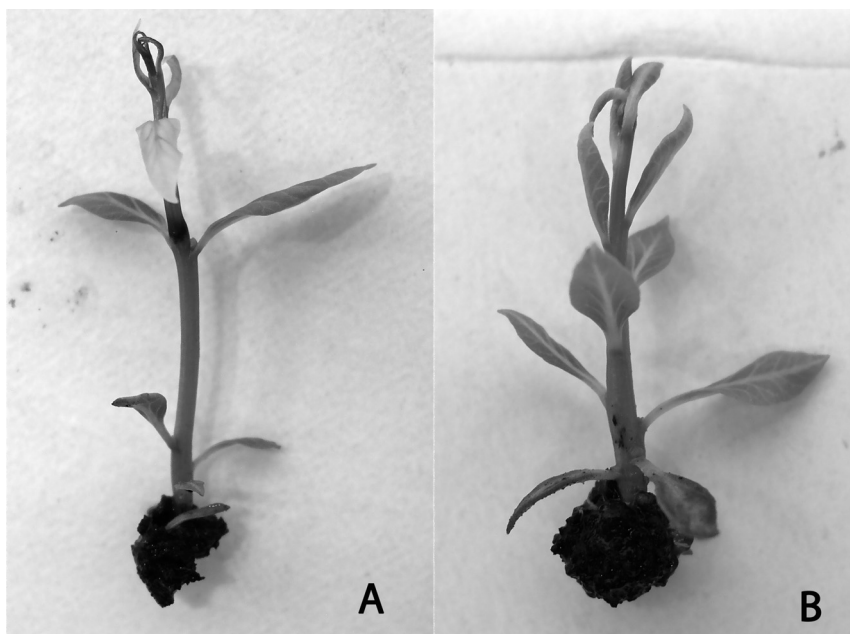


Figura 1. Brotes de *Pistacia vera* cultivados in vitro. A. Brote mostrando síntomas de necrosis apical. B. Brote sano.

Figure 1. *Pistacia vera* shoots grown in vitro. A. Shoot showing shoot-tip necrosis. B. Healthy shoot.

Alderson, 1989; George, 1993). El ion Ca^{2+} está involucrado en la morfogénesis in vitro y se requiere para muchas de las respuestas inducidas en las plantas por los reguladores de crecimiento (George, 1993). Una de las di-

ferencias más notables entre los diferentes medios de cultivo empleados es la concentración de calcio, así, el medio DKW triplica su concentración respecto a MS y a WPM, sin embargo, el boro tiene una concentración si-

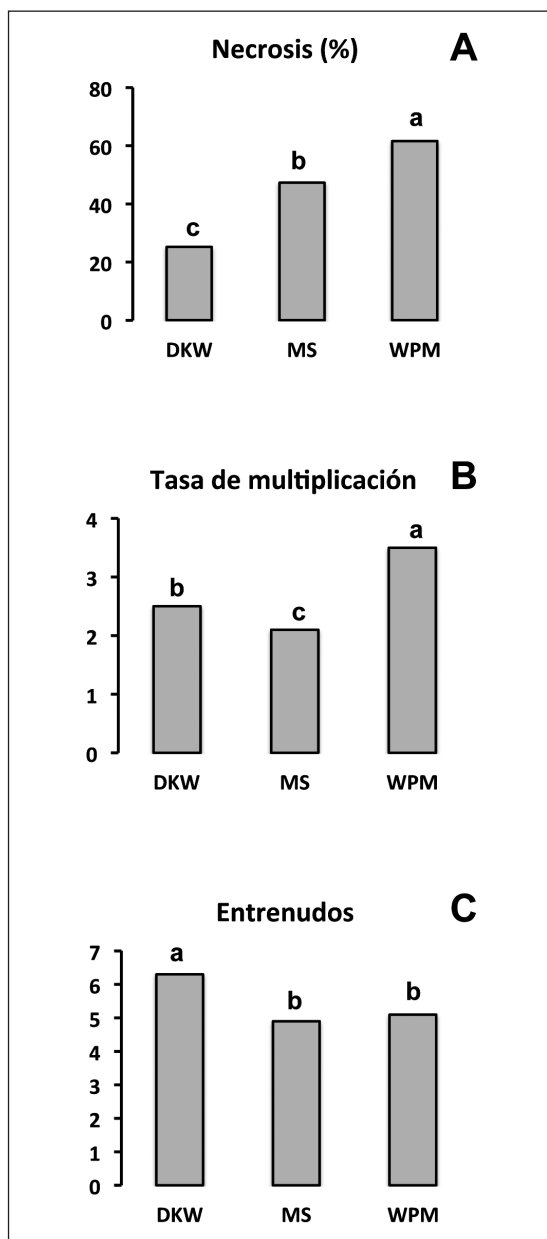


Figura 2. Comparación de diferentes medios de cultivo con brotes de *Pistacia vera*. A. Porcentaje de brotes mostrando necrosis apical. B. Tasa de multiplicación (número de brotes finales por cada brote inicial). C. Número de entrenudos por brote. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los medios de cultivo.

Figure 2. Culture media comparisons with shoot cultures of *Pistacia vera*. A. Percentage of shoots showing apical necrosis. B. Multiplication rate (final number of shoots per shoot). C. Internode number per shoot. Different letters indicate significant differences ($p < 0.001$) among culture media.

milar. La deficiencia de calcio en las plantas ha sido asociada con necrosis apical y un pobre crecimiento de las raíces en diversas especies cultivadas in vitro, como el pistacho (Barghchi y Alderson, 1989 y 1996) y otras plantas leñosas (Singha *et al.*, 1990; Piagnani *et al.*, 1996; Bairu *et al.*, 2009; Thakur y Kanwar, 2011). La menor incidencia de la necrosis apical observada en el medio DKW podría estar relacionada con su mayor concentración en calcio (Figura 2).

La aparición de necrosis apical es un problema importante en cultivo in vitro, ya que obliga, bien a aumentar la frecuencia de los subcultivos, reduciendo el tiempo entre subcultivos a 3 semanas o menos para minimizar su incidencia, bien a la aplicación de diferentes tratamientos que disminuyan su presencia.

La necrosis apical se ha reducido de forma altamente significativa ($p < 0.001$) gracias a la aplicación de distintos tratamientos, como el enfriamiento basal, el uso de un frasco ventilado de mayor volumen o la reducción del número de brotes, en los que las diferencias en el porcentaje de brotes con ápices necrosados fueron estadísticamente significativas con respecto al control (Figura 3). Sin embargo, la adición de gluconato de calcio no mostró una reducción apreciable en la necrosis apical (Figura 3). En *P. vera* la adición de Ca al medio de cultivo produjo una reducción en la incidencia de necrosis cuando los brotes se multiplicaron en medio MS, sin afectar a la multiplicación de brotes, y no así la adición de boro (Abousalim y Mantell, 1994; Barghchi y Alderson, 1996). El aumento de la concentra-

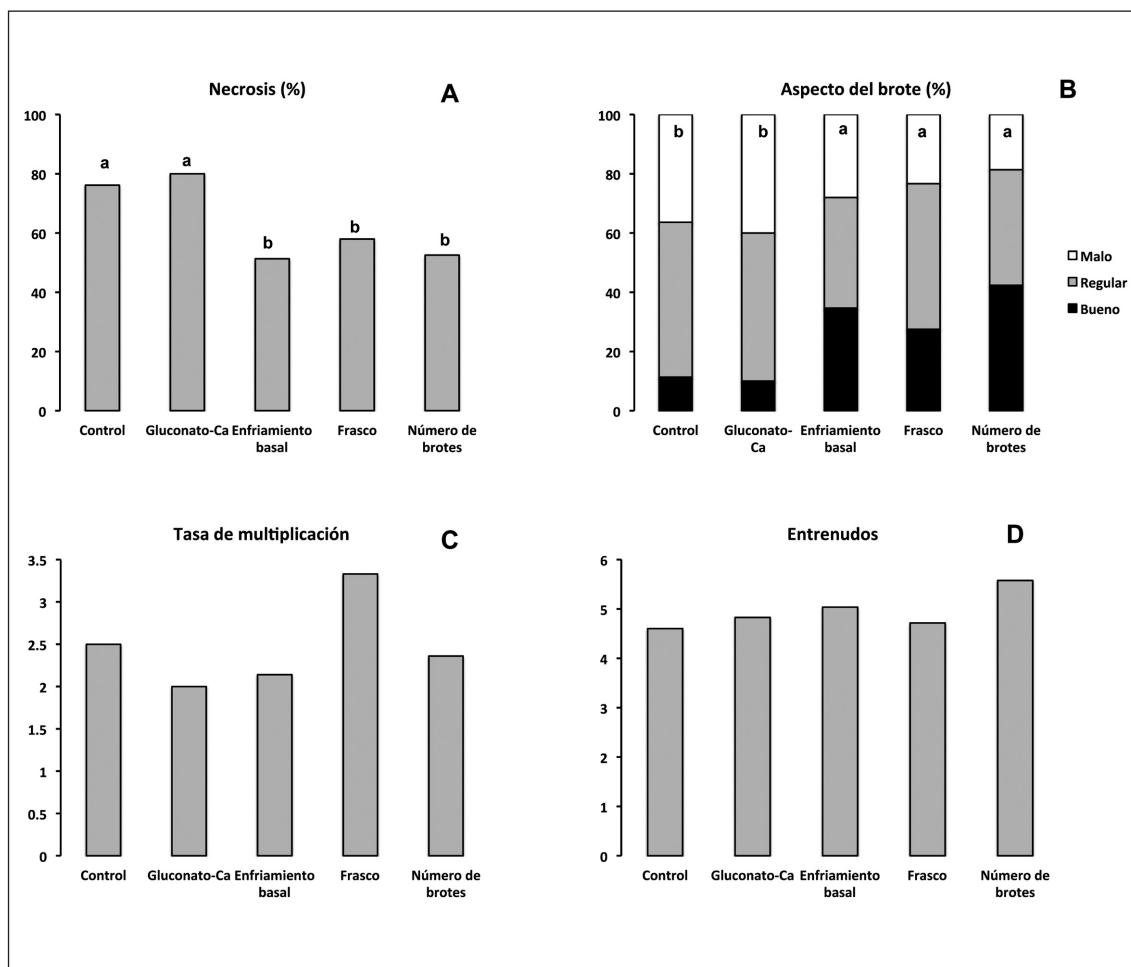


Figura 3. Efecto de los diferentes tratamientos en el cultivo de brotes de *Pistacia vera* in vitro, tras seis semanas de cultivo. A. Porcentajes de brotes que mostraban necrosis apical. B. Porcentaje de brotes en las diferentes categorías según su calidad para cada tratamiento. C. Tasa de multiplicación (número de brotes finales por brote). D. Número de entrenudos por brote. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los tratamientos.

Figure 3. Effect of different treatments on *Pistacia vera* shoot culture in vitro. A. Percentages of shoots showing apical necrosis. B. Percentages of shoots from different categories depending on their shoot quality –low, intermediate or high. C. Multiplication rate (final number of shoots per shoot). D. Internode number per shoot. Different letters indicate significant differences ($p < 0.001$) among treatments.

ción de calcio no ha tenido un efecto sobre la necrosis en este trabajo lo que sugiere que el medio DKW tiene ya una concentración de calcio suficiente, de manera que la incidencia

sobre la necrosis no ha mejorado con la adición de 3 mM de gluconato de calcio. Ésto viene reforzado al compararlo con los otros medios de cultivo empleados (MS y WPM) que

contienen una concentración de calcio tres veces menor que el medio DKW y en los que la necrosis apical fue muy superior (Figura 2).

Por otra parte, el menor número de brotes por frasco de cultivo (5 brotes frente a 7 en el control) ha tenido, asimismo, un efecto importante en la reducción de la necrosis apical, siendo el tratamiento que presentó el menor porcentaje de brotes con necrosis, con una diferencia muy significativa ($p < 0.001$) respecto al control y al tratamiento con gluconato de calcio, aunque las diferencias no son significativas respecto a los tratamientos de enfriamiento basal y al frasco de cultivo de mayor volumen (Figura 3), quizá por el tamaño de la muestra. La mayor disponibilidad de medio de cultivo por brote cultivado, aumentada en el tratamiento con menor número de brotes (un 40%) y en el cultivo en frascos de gran volumen (94%) parece tener un efecto beneficioso, similar al aumento de la transpiración debido al enfriamiento basal o la aireación (Figura 3) en la necrosis apical. En otros trabajos la reducción de la humedad relativa o el aumento de la aireación en los frascos no produjeron ningún efecto sobre la necrosis apical en pistacho (Barghchi y Alderson, 1996). El volumen del contenedor usado para cultivo *in vitro* y el número de brotes cultivados puede afectar al crecimiento y morfogénesis *in vitro* probablemente debido a que produce cambios en la concentración de oxígeno, dióxido de carbono, etileno u otros volátiles (George, 1993). También producen un cambio en la proporción explanto/medio, explanto/aire o medio/aire lo que podría estar relacionado con la necrosis apical.

La calidad de los brotes obtenidos tras el cultivo durante 6 semanas en los diferentes tratamientos se valoró evaluando diferentes caracteres del brote además de la necrosis apical. El porte de los brotes obtenidos con los distintos tratamientos fue significativamente mejor en los tratamientos en los que también se redujo la necrosis apical: enfriamiento basal o

número de brotes. Sin embargo, en el tratamiento del frasco de cultivo de mayor volumen y aireado, muchos de estos brotes presentaban un porte "regular", inferior a los tratamientos anteriores, lo que puede deberse a que este aumento de medio y de volumen por brote no esté tan equilibrado como en el caso de la reducción del número de brotes. En nuestras condiciones, la reducción del número de brotes supuso un aumento del 40% del volumen de aire por brote respecto al control, mientras que fue del 500% en el caso del frasco de mayor volumen. En general las condiciones óptimas tanto de la forma como del tamaño del frasco de cultivo son muy diferentes entre especies y varían también al variar otros factores como el tipo de material del recipiente, tipo de cierre o volumen del medio de cultivo (George, 1993).

La tasa de multiplicación después de las 6 semanas de cultivo bajo los diferentes tratamientos mostró que el cultivo en frascos de gran volumen con aireación presentaba la mayor tasa de multiplicación, obteniéndose un número de brotes final notablemente superior a los demás tratamientos, aunque estos fueran de menor calidad. El tratamiento de menor número de brotes por frasco de cultivo mostró una tasa de multiplicación similar al control pero con un mayor número de entrenudos por brote (Figura 3), aunque no muestran diferencias significativas en conjunto. Esto sugiere que la necrosis no afecta al desarrollo del brote desde el inicio, sino que aparecería tras un determinado grado de desarrollo. La mayor disponibilidad de medio de cultivo no parece tener una relación directa con el número de entrenudos que parecen depender de otros factores como los reguladores de crecimiento (Sghir *et al.*, 2005), pero la tasa de multiplicación fue máxima en el frasco de mayor volumen, cuando la disponibilidad de medio de cultivo fue mayor.

Tanto la mejora de la transpiración de los brotes, como la mayor disponibilidad de medio

de cultivo por brote cultivado son beneficiosas para el cultivo de pistacho in vitro, reduciendo la aparición de ápices necrosados y mejorando la calidad del brote, con un color más verde y mayor turgencia. El aumento del gradiente de humedad relativa dentro del frasco, desde la superficie del medio de cultivo hasta la tapa del frasco, que favorece una mayor transpiración y mejora el transporte de nutrientes hasta la parte superior del brote, se ha realizado por una parte, mediante el enfriamiento basal, creando un gradiente térmico de 6°C entre la base del frasco y el ambiente de la cámara, y por otra, mediante la utilización de tapas con membranas porosas de 0.22 µm de diámetro de poro que permiten el intercambio de gases, pero no la entrada de microorganismos.

En este trabajo se ha estudiado la necrosis apical en diferentes medios de cultivo y el efecto de diferentes factores (adición de calcio, enfriamiento basal, número de brotes por frasco o frascos ventilados de mayor volumen) en la necrosis apical, en el desarrollo de los brotes de pistacho in vitro y en su calidad. Los resultados indican que un bajo porcentaje de brotes con necrosis apical y el desarrollo de brotes de buena calidad están asociados con un medio de cultivo enriquecido en calcio hasta un nivel óptimo, con una mayor cantidad de medio de cultivo por brote y con una mayor transpiración y transporte de nutrientes a través de los brotes.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto INIA-FEDER RTA2010-00053-C03-03 y por la ayuda recibida del Gobierno de Aragón como Grupo de Excelencia A-43.

Referencias bibliográficas

- Abousalim A, Mantell SH, 1994. A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in in-vitro shoot cultures of *Pistacia-vera cv Ma-teur*. J Horticult Sci, 69: 357-365.
- Bairu MW, Stirk WA, Van Staden J, 2009. Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. Plant Cell Tiss Organ Cult, 98: 239-248.
- Barghchi M, Alderson PG, 1985. In vitro propagation of *Pistacia vera* L. and the commercial cultivars Ohadi and Kalleghochi. J Horticult Sci, 60: 425-430.
- Barghchi M, Alderson PG, 1989. Pistachio (*Pistacia vera* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 5. Trees II. Bajaj, YPS (Ed.) Springer-Verlag, Berlin. pp: 68-98.
- Barghchi M, Alderson PG, 1996. The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L in vitro. Plant Growth Regulation, 20: 31-35.
- De Proft M, Maene LJ, Debergh, PC, 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured in vitro. Physiol Plant, 65: 375-379.
- Driver JA, Kuniyuki AH, 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience, 19: 507-509.
- García E, Lorente P, Marín JA, Arbeloa A, Andreu P, 2010. Micropropagación e injerto in vitro de pistacho. ITEA, 106: 294-02.
- George EF, 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1 The Technology. Exegetics Ltd. England. 555 pags.
- Jain N, Bairu MW, Stirk WA, Dolezal K, van Staden J, 2009. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. S Afr J Bot, 75: 117-121.
- Lloyd G, McCown B, 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. HortScience, 15: 416.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15: 473-497.

- Piagnani C, Zocchi G, Mignani I, 1996. The influence of Ca^{2+} and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill) in vitro shoot-tip necrosis. *Plant Sci*, 118: 89-95.
- Podwysznska M, Goszczynska DM, 1998. Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and action, as well as calcium and magnesium on rose shoot rooting, shoot-tip necrosis and leaf senescence in vitro. *Acta Physiol Plantarum*, 20: 91-98.
- R Development Core Team, 2008. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 1 June 2009. <http://www.R-project.org>
- Sghir S, Chatelet P, Ouazzani N, Dosba F, Belkoura I, 2005. Micropropagation of Eight Moroccan and French Olive Cultivars. *HortScience*, 40: 193-196.
- Singha S, Townsend EC, Oberly GH, 1990. Relationship between calcium ad agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 23: 135-142.
- Thakur A, Kanwar JS, 2011. Effect of phase of medium, growth regulators and nutrient supplementations on in vitro shoot-tip necrosis in pear New Zealand *Journal of Crop and Horticultural Science*, 39: 131-140.
- (Aceptado para publicación el 3 de noviembre de 2011)