

Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf

Elisa Quiala¹, Raúl Barbón¹, Elio Jiménez¹, Manuel de Feria¹, Alina Capote¹, Naivy Pérez¹, Maité Chávez¹ e Igor Bidot². *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Fax 53(42)281329. e-mail: quiala@uclv.edu.cu

² Centro Universitario de Guantánamo. Carretera a Santiago de Cuba Km. 2 ½, Guantánamo, Cuba.

RESUMEN

Se establecieron suspensiones celulares a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf, según la metodología descrita por Freire (1998), para el cultivo de la caña de azúcar y posteriormente modificada por Licea y Gómez (2000) para el cultivo de callos de Caña Santa. Con el objetivo de analizar el efecto de la densidad celular sobre el crecimiento celular, se estudió el comportamiento de la masa fresca, masa seca y el pH en tres densidades de inóculo (20, 40 y 60 gMF.I⁻¹). Se evaluó el desarrollo de raíces en los agregados celulares y se analizó además la influencia del explante sobre la formación de callos directamente en medio de cultivo líquido, a partir de plantas cultivadas *in vitro*. El mayor incremento de masa fresca se obtuvo cuando se empleó 20 gMF.I⁻¹. Los valores de masa seca se comportaron de manera similar, obteniéndose la mayor tasa de crecimiento en este mismo tratamiento. El pH en las tres densidades de inóculo estudiadas, disminuyó durante los primeros ocho días y se mantuvo estable a partir de este momento. La presencia de raíces solo se apreció en los agregados celulares cultivados en medio de cultivo sin agua de coco. La formación de callos directamente en medio de cultivo líquido solo tuvo lugar en el cilindro de la vaina de las hojas más próximo a la zona meristemática.

Palabras clave: agua de coco, Caña Santa, formación de raíces, producción de biomasa

ABSTRACT

Cellular suspensions settled down starting from callus of *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf cultivated in semisolid medium, according to the methodology described for Freire (1998), for the cultivation of the cane of sugar and later on modified by Licea and Gómez (2000) for the cultivated callus of Cane Santa, with the objective of analyzing the effect of the cellular density on the cellular growth, being studied the behavior of the fresh mass, dry mass and the pH in three inocule densities (20, 40 and 60 gMF.I⁻¹). The development of roots was evaluated in the cellular aggregated and it was also analyzed directly the influence of the explants on the callus formation cultivated directly in liquid medium, starting from cultivated plants *in vitro*. The biggest increment of fresh mass was obtained when 20 gMF.I⁻¹ was used, the values of mass dry off they behaved in a similar way, being obtained the biggest rate of growth in this same treatment. The pH in the three densities of studied inocule, diminished during the first eight days and stayed stable starting from this moment. The alone presence of roots was appreciated only in the cellular aggregated cultivated without coconut water. The formation of callus directly in liquid medium took place in the region near to the meristematic area.

Key words: coconut water, biomass production, lemon grass, root formation

INTRODUCCIÓN

Las plantas superiores producen una gran variedad de productos secundarios los cuales juegan un minoritario rol en los procesos básicos de la vida de las plantas, pero con frecuencia tienen un papel ecológico, como atrayentes de polinizadores y defensa química contra microorganismos, insectos y predadores superiores (Wink, 1988).

Muchos de estos compuestos son empleados en la industria farmacéutica, como productos químicos o como suplemento alimentario y aunque algunos de ellos han sido reemplazados por productos químicos sintéticos dado por el menor costo

que implica la producción de estos últimos, un número considerable de productos naturales comercialmente importantes aún son obtenidos a partir de plantas (Saverwein *et al.*, 1992, Misawa 1994).

La obtención de estos compuestos está confinada a seguir dependiendo de su extracción a partir de plantas, ya que algunos componentes son difíciles de sintetizar químicamente. Por otro lado durante los últimos 30 años se ha ido incrementando el interés de los científicos para obtener productos naturales de alto valor a través del cultivo de células, lo cual puede resolver muchos de los problemas que se presentan a escala industrial

durante la extracción de estos compuestos fitoquímicos a partir de plantas cultivada en condiciones de campo.

El cultivo de células no solo provee una herramienta para la síntesis de compuestos naturales, sino que permite además la bioconversión de componentes de bajo valor en productos de alto valor. Por otro lado muchos de estos compuestos producidos durante el cultivo de células no se producen en las plantas intactas. A través del cultivo de células se puede inducir la formación de material vegetal específico (embriones, raíz, hojas), lo cual es muy ventajoso ya que algunos de estos metabolitos secundarios solo se producen cuando las estructuras indiferenciadas son inducidas a la diferenciación, ya sea por vía organogénica o embriogénica y algunos de ellos se producen en mayor medida en órganos específicos (Misawa, 1994).

La Caña Santa o Caña de Limón (*Cymbopogon citratus* (D.C) Staff) es una planta medicinal a la cual se le atribuye una gran cantidad de propiedades medicinales, por lo que la obtención de biomasa a partir de agregados celulares cultivados *in vitro* podría constituir una vía para la obtención de metabolitos secundarios.

Teniendo en cuenta la problemática antes planteada se propuso en este trabajo como objetivos principales: La obtención de biomasa a partir del establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de Caña Santa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos desarrollados para el establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares del cultivo *in vitro* de la Caña Santa se realizaron en el laboratorio de Biorreactores del Instituto de Biotecnología de Las Plantas de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas.

Se emplearon dos vías para el establecimiento de las suspensiones celulares, una a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido según el protocolo de cultivo descrito por Gómez (1994) y otra a partir de callos inducidos directamente en medio de cultivo líquido a partir de segmentos de las vainas de las hojas de plantas cultivadas *in vitro* según el protocolo descrito por Freire (2001), ambas metodologías desarrolladas para el cultivo de la caña de azúcar.

Establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido

Formación de callos

Se tomaron spindles (conjunto de hojas arrolladas que envuelven el meristemo vegetativo) a partir de una planta cultivada en condiciones de campo (Figura 1), a las muestras seleccionadas se le eliminaron las hojas más maduras que envuelven el ápice y posteriormente se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 3.0% (v/v) durante 12 minutos. En condiciones asépticas se eliminaron las hojas arrolladas hasta llegar a las hojas más jóvenes que envuelven el meristemo apical, denominadas hojas A y B según la clasificación realizada por Guiderdoni y Demarly (1988) para el cultivo de la caña de azúcar, las mismas fueron fraccionadas en pequeños discos, con un diámetro de 3.0 – 5.0 mm. Se tomaron los primeros cinco discos desde la base del meristemo hacia arriba, sin incluir la región del meristemo y se sembraron en el medio de cultivo de formación de callos Payán *et al.* (1977) modificado con 5.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Los explantes permanecieron en dicho medio durante tres semanas. Se realizaron dos multiplicaciones sucesivas de los callos, con una frecuencia de subcultivo de tres semanas en el medio de cultivo propuesto por Heinz y Mee (1969) modificado 5.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Las diferentes fases de crecimiento y multiplicación de los callos se realizaron en condiciones de oscuridad y 28 ± 2°C de temperatura.

Los medios de cultivos fueron autoclaveados durante 20 minutos en una autoclave Sakura a 120 °C y 1.2 Kg.cm² de presión.

Establecimiento de suspensiones celulares

Se establecieron suspensiones celulares a partir de callos cultivados según la metodología descrita anteriormente, para ello se inocularon 2.0 g en 50 ml de medio de cultivo líquido, el cual estuvo compuesto por el 100% de las sales Murashige y Skoog, 1962 (sales MS), 10 ml.l⁻¹ de las vitaminas Heinz y Mee, 1969 (Vitaminas H), 1.0 g.l⁻¹ de caseína hidrolizada, 50 mg.l⁻¹ de L-arginina, 50 mg.l⁻¹ de ácido cítrico, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 5.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, 50 ml l⁻¹ de agua de coco y 40 g.l⁻¹ de sacarosa. Semanalmente se adicionaron 25 ml de medio de cultivo durante dos semanas y posteriormente se renovó el 25% del medio de cultivo cada siete días durante dos semanas, transcurrido este tiempo se realizó el subcultivo de las suspensiones celulares.

Las suspensiones obtenidas fueron utilizadas para estudiar el efecto de la densidad celular sobre la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares.

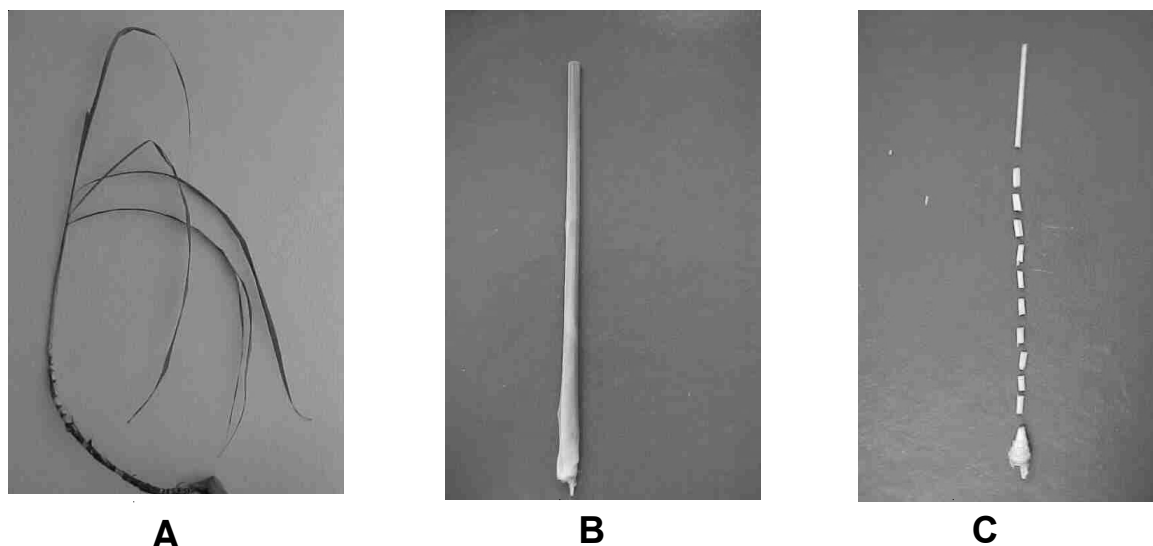


Figura1. A)- Planta de Caña Santa procedente de condiciones de campo, B)- Spindle procedente de una planta de campo de Caña Santa, C)- Disección de las hojas A y B para el establecimiento de los callos.

Efecto de la densidad de inóculo sobre el crecimiento celular

El objetivo de este experimento fue evaluar la influencia de la densidad celular en la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares y determinar un valor mínimo de inóculo que permitiera una correcta multiplicación de las mismas.

Se estudiaron tres densidades de inóculo 2.0, 4.0 y 6.0 gMF en 100 ml de medio de cultivo líquido descrito anteriormente para el establecimiento de suspensiones celulares, para lo cual se utilizaron erlenmeyers de 250 ml de capacidad, con cuatro réplicas por tratamiento. El peso de la masa fresca del inóculo se determinó con la ayuda de una balanza Sartorius.

Para la confección de las curvas de crecimiento se procedió de la siguiente manera:

En días alternos durante 12 días y comenzando por el día cero se extrajo con la ayuda de una pipeta automática (Pipetboy) 5.0 ml de cada suspensión celular y se determinó el volumen de células sedimentadas, el pH, el peso de la masa fresca (gMF) y el peso de la masa seca (gMS).

Para el análisis del comportamiento de estos parámetros los datos experimentales obtenidos fueron procesados empleando el programa CurvaExpert Versión 1.3 para Windows.

Desarrollo de órganos a partir de agregados celulares de Caña Santa

Se estudió el desarrollo de los agregados celulares en dos variantes de medio de cultivo uno con 50 ml.l⁻¹ de agua de coco y otro sin

agua de coco, con el objetivo de determinar la influencia de este componente natural en la formación de raíces. Para ello se emplearon suspensiones celulares obtenidas a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido. Se utilizó una densidad de inóculo de 2.0 g en 100 ml de medio de cultivo. La renovación del mismo se realizó semanalmente, en un 25%. Se emplearon cuatro réplicas por tratamiento y a los 15 días del cultivo se evaluó la presencia o no de órganos (raíces) en los agregados celulares.

Establecimiento de suspensiones celulares de Caña Santa a partir de callos de plantas cultivadas *in vitro*

Influencia del tipo de explante en la formación de los callos directamente en medio de cultivo líquido

Se emplearon plantas cultivadas *in vitro* con cuatro subcultivos, las mismas fueron colocadas previamente en un medio de cultivo de crecimiento durante 21 días, con el objetivo de aumentar el grosor del tallo de las plantas. El mismo estuvo compuesto por el 100% de las sales MS, 10 ml.l⁻¹ de vitaminas H, 1.0 g.l⁻¹ caseína hidrolizada, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 180 ml.l⁻¹ de agua de coco, 0.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y gelificado con Agar, 7.0 g.l⁻¹. Transcurridas las tres semanas de cultivo en este medio de cultivo se seleccionaron plantas que tenían entre 1.5 – 2.0 mm de grosor del tallo. Las vainas de las hojas fueron cortadas en tres segmentos según se muestra en la figura 2, después de haber sido eliminada la base de la planta que contiene el meristemo vegetativo. Cada segmento fue seccionado con un tamaño aproximado 5.0 – 7.0 mm.



Segmento 0: Región que contiene el meristemo vegetativo.

Segmento 1: Se eliminó la base de las plantas *in vitro* (segmento 0 de 2.0-3.0 mm) y se tomó un cilindro de la vaina de las hojas de 5.0 mm de largo.

Segmento 2: Por encima del segmento 1 se tomó un cilindro de 5.0 mm de largo.

Segmento 3. Por encima del segmento 2 se tomó un cilindro de 5.0 mm de largo

Figura 2. Disección de una planta cultivada *in vitro* de Caña Santa utilizada para la formación de callos en medio de cultivo líquido.

Los explantes obtenidos fueron colocados indistintamente según el segmento en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 30 ml. El experimento se desarrolló en agitador orbital, en condiciones de oscuridad y 26 ± 2 °C de temperatura. Se distribuyeron seis explantes por Erlenmeyers y se emplearon cuatro réplicas por tratamiento.

A los 15 días de cultivo se adicionaron 30 ml de medio de cultivo fresco y a partir de ese momento semanalmente se añadieron 10 ml de medio de cultivo durante cuatro semanas, transcurrido este tiempo se evaluó la formación o no de callos en los explantes. Los callos formados fueron separados de la restante porción del segmento y subcultivados a medio de cultivo fresco, para lo cual se inocularon 2.0 gMF en 100 ml de medio de cultivo para el establecimiento de la suspensión celular. La renovación del medio de cultivo se

realizó con una frecuencia de siete días durante tres semanas, renovándose el 25% del mismo. Al cabo de tres semanas se realizó el subcultivo de las mismas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido

Efecto de la densidad de inóculo sobre el crecimiento celular

Se establecieron exitosamente suspensiones celulares a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido (Figura 3). Las mismas se caracterizaron por una coloración amarilla intensa de los agregados celulares y células redondas y pequeñas de tipo meristemáticas.

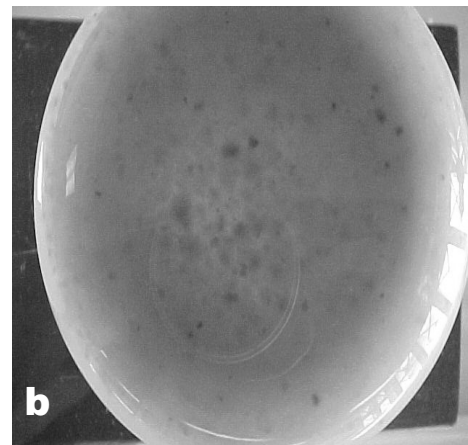
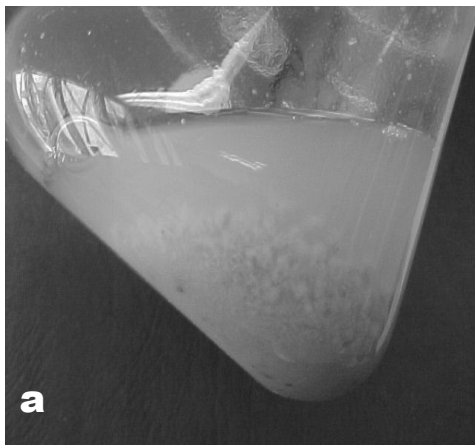


Figura 3. Suspensiones celulares de Caña Santa establecidas a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido (a-Vista lateral y b-Vista inferior del Erlenmeyer).

Las suspensiones celulares mostraron en las tres densidades de inóculo estudiadas un ritmo de crecimiento exponencial del volumen de células sedimentadas.

El incremento de la masa fresca en las tres densidades fue similar a los 12 días de cultivo (Figura 4), la tasa de crecimiento fue mayor cuando se emplearon 20 g.l^{-1} , este incremento fue de 9.4 veces (189.1 gMF.l^{-1}) con respecto a la densidad inicial inoculada, mientras que en las densidades con 40 y

60 gMF.l^{-1} el incremento de la biomasa fue solo de 4.8 y 3.8 veces respectivamente en el mismo período de tiempo.

Como consecuencia del incremento de la masa fresca se produjo también un aumento en los valores de masa seca. La mayor tasa de crecimiento se obtuvo también en el tratamiento con 20 g.l^{-1} de densidad de inóculo (Figura 5), el valor peso seco obtenido en este tratamiento al final del cultivo fue de 10.6 veces mayor que el valor inicial.

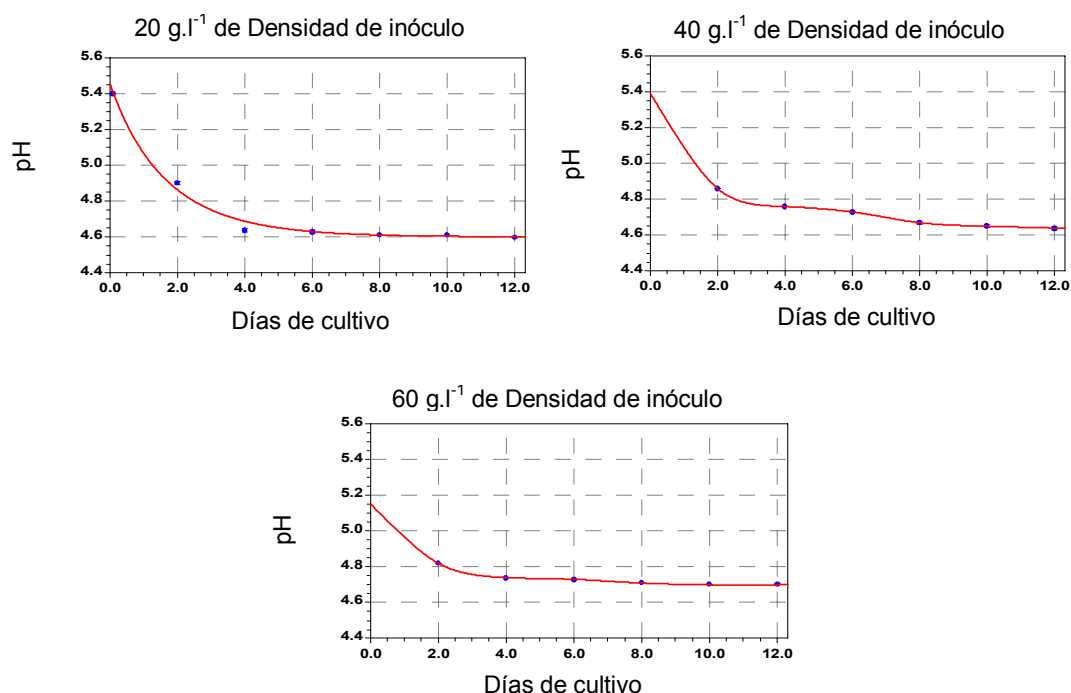


Figura 4. Comportamiento del peso de la masa fresca con tres densidades de inóculo iniciales, durante el cultivo de suspensiones celulares de Caña Santa.

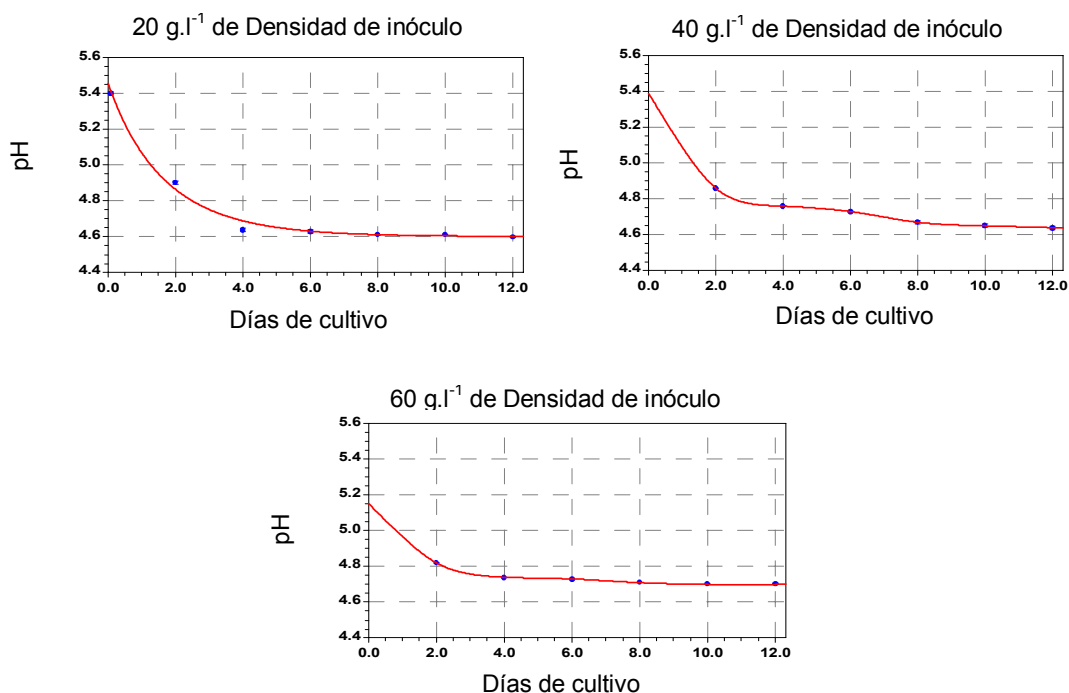


Figura 5. Comportamiento del peso de la masa seca con tres densidades de inóculo inicial, durante el cultivo de suspensiones celulares de Caña Santa.

Otra variable evaluada desde el inicio del proceso fue el pH (figura 6), el cual tuvo similar comportamiento en las tres densidades de inóculo

estudiadas. El mismo disminuyó durante los primeros ocho días y se mantuvo estable a partir de este momento.

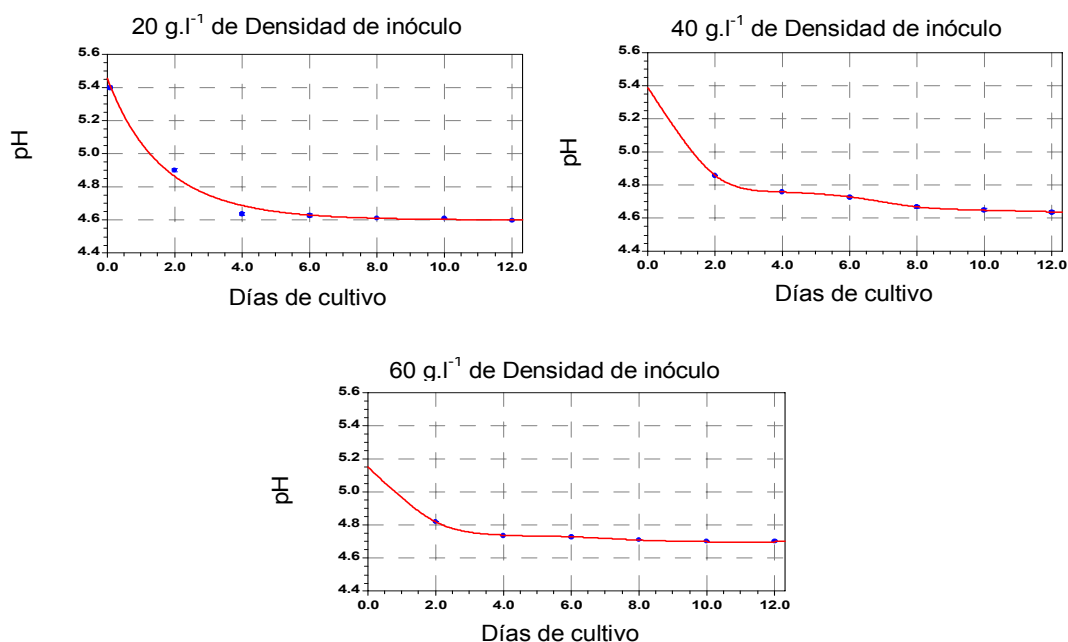


Figura 6. Comportamiento del pH con tres densidades de inóculo inicial, durante el cultivo de las suspensiones celulares de Caña Santa.

Desarrollo de órganos a partir de agregados celulares de Caña Santa

Los agregados celulares cultivados en medio de cultivo con agua de coco se multiplicaron satisfactoriamente y mantuvieron una coloración amarillo intenso y no se apreció en ellos la presencia de raíces (Figura 7a), sin embargo, todo lo contrario ocurrió en los agregados celulares cultivados en medio de cultivo sin agua de coco, donde casi la totalidad de los agregados desarrollaron abundantes raíces (Figura 7b).

El agua de coco es un componente natural el cual además de su comprobado contenido de reguladores del crecimiento es rico en componentes nutritivos como aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos y otros elementos nitrogenados (Krikorian, 1993) estos compuestos, a determinadas concentraciones, pueden constituir un aporte esencial en el desarrollo de diferentes procesos morfogénéticos.

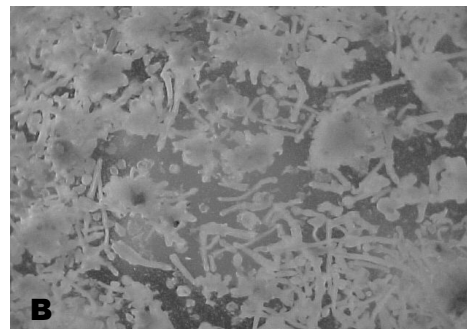
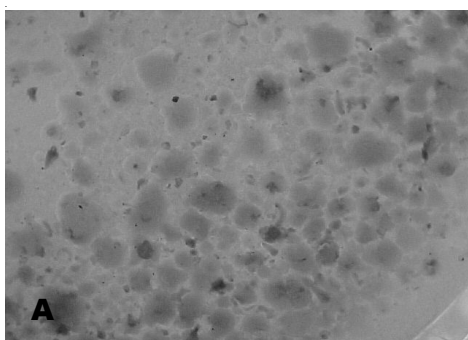


Figura 7. A) Agregados celulares cultivados de Caña Santa en medio de cultivo con agua de coco, B) Agregados celulares de Caña Santa cultivados en medio de cultivo sin agua de coco.

Establecimiento de suspensiones celulares de Caña Santa a partir de callos de plantas cultivadas *in vitro*

Influencia del tipo de explante en la formación de callos directamente en medio de cultivo líquido

La formación de callos solo tuvo lugar en el segmento 1, donde el 100% de los explantes formó callos a partir de la segunda semana de cultivo (Figura 8). Este evento estuvo antecedido por una elongación hacia ambos extremos de la hoja más interna de los segmentos. Los callos se formaron

a un solo extremo del explante, lo cual coincidió con la región más próxima a la zona del meristemo vegetativo. Este resultado fue comprobado en estudios preliminares realizados en medio de cultivo semisólido, donde se evaluó

el comportamiento de estos mismos segmentos (1, 2 y 3) en medio de cultivo de formación de callos. Los callos solo se formaron en el segmento 1 y en el extremo que correspondió a la zona más cercana del meristemo vegetativo.



Figura 8. Formación de callos de Caña Santa en medio de cultivo líquido a partir del segmento 1 de plantas cultivadas *in vitro*.

Freire (2001) refirió que en un experimento similar realizado a partir de plantas cultivadas *in vitro* de caña de azúcar obtuvo formación de callos en los tres segmentos, pero el mayor porcentaje de callos tuvo lugar en el segmento 2.

CONCLUSIONES

Se establecieron suspensiones celulares de Caña Santa a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido y del segmento 1 de la vaina de las hojas de plantas cultivadas *in vitro*. El crecimiento óptimo de las suspensiones celulares se logró cuando se utilizó 20 gmfl⁻¹ como densidad de inóculo. La presencia de raíces en los agregados celulares tuvo lugar en ausencia de agua de coco en el medio de cultivo.

REFERENCIAS

- Freire, M (1998) Embriogénesis somática de caña de azúcar *Saccharum* spp L. var C87-51. Tesis de Maestría. Universidad Central de Las Villas, Santa Clara. Cuba. p 76
- Freire, M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. C 87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas, Santa Clara. Cuba.
- Guiderdoni, E.; Demarly, Y (1988) Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 14, pp. 71 – 88

Heinz, DJ y Mee, G.W.P (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci.* (9):346-348

Krikorian, DA (1993) Medios de cultivo, generalidades, composición y preparación. En: Mroginski, M y W, Roca (Eds) *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentación y Aplicaciones* pp. 41 – 77

Licea, R y Gómez, R (2000) Regeneración *in vitro* de brotes de Caña Santa (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf.). Programa y Resúmenes del XII Seminario Científico. INCA 155 p.

Misawa (1994) *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites*. FAO Agriculture Services Bull., Rome, 57 pp.

Payán, A, Carmen, H, Tascón, G (1977) Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) mediante el cultivo de tejidos y yemas. *Acta Agronómica* (Columbia), 37: pp 43 – 79

Roca, W M y Mroginski, L A (1993) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicación*. Public. CIAT. Colombia. ed. XYZ, 151: pp 670

Saverwein, M, Yoshimatsu, K y Shimomura, K (1992) Further approaches in the production of the secondary metabolites by plant tissue cultures. *Plant Tissue Cult. Lett.*, 9: 1- 9

Vasil, IK, Henke R, Hughes K, Constantin M y Hollander, (1985) Somatic embryogenesis and its consequences in gramineae. En: *Tissue Culture forestry and Agriculture*. (Eds). Plenum N.Y. p 31-47

Wink, M (1988) Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 225 – 233