

Empleo del Vitrofurax en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. híbrido var Cuba 87- 51

Elisa Quiala*, Elio Jiménez, Manuel de Feria, Yelenys Alvarado, Maité Chávez, Daniel Agramonte, Daymí Ramírez, Mayra Acosta, Nayvi Pérez y Alina Capote. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5,5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba CP 54830. Teléfono 281268-281257. Fax: 53-422-281329. FAX: 422-811329; e-mail: quiala@uclv.etcscs.cu.

RESUMEN

La contaminación microbiana del endospermo sintético es uno de los principales problemas que enfrenta la tecnología de la semilla artificial. En el presente trabajo se realizó un estudio sobre el efecto del Vitrofurax en el control de contaminantes en la cápsula, así como el efecto tóxico de este producto sobre los embriones somáticos de caña de azúcar. Se emplearon concentraciones de 20, 25, 30, 35 y 40 mg.l⁻¹, estas fueron aplicadas al medio de cultivo con embriones somáticos desnudos. Este medio de cultivo fue empleado autoclaveado y sin autoclavear, posteriormente se añadieron estas mismas concentraciones al endospermo sintético de los embriones encapsulados de caña de azúcar. Se comprobó que el Vitrofurax puede ser empleado en la esterilización química de los medios de cultivo para la germinación *in vitro* de los embriones somáticos, así como en la protección química del endospermo sintético, lo cual permitió eliminar el autoclaveo del medio de cultivo de encapsulación, así como reducir la concentración de los agentes gelificantes en un 33% y realizar todas las operaciones en condiciones no estériles.

Palabras clave: Encapsulación, caña de azúcar, semilla sintética

ABSTRACT

The effect of the Vitrofurax in the control of pollutants in the capsule study was carried out, as well as its toxic effect on the somatic embryos of sugar cane. Different dose of this compound was used (20, 25, 30, 35 and 40 mg l⁻¹), these they were applied to the cultivation medium with nudes somatic embryos, which was used previously autoclaved and without autoclaved, later these same doses were added to the synthetic endosperm. The Vitrofurax can be employed in the chemical sterilization of the cultivation medium for the germination *in vitro* of the somatic embryos, as well as in the chemical protection of the synthetic endosperm, that which allowed to eliminate the autoclaved of the encapsulation medium, as well as to reduce the concentration of the agents gelificantes in 33% and to carry out all the operations under non sterile conditions.

Key words: Encapsulation, sugarcane, synthetic seed

Abreviaturas: ESD- Embriones Somáticos Desnudos, ESE- Embriones Somáticos Encapsulados, MS- Murashige y Skoog (1962).

INTRODUCCIÓN

La aplicación práctica de la tecnología de semilla sintética requiere del desarrollo de protocolos para la producción en masa de embriones somáticos a escala de biorreactores, los cuales se desarrollan de forma sincrónica y presentan alta tasa de conversión en plantas. Como segundo aspecto fundamental es necesario contar con procedimientos de encapsulación que preserven la viabilidad y capacidad de germinación de los embriones y garanticen la protección de las semillas contra daños mecánicos, plagas y enfermedades (Jiménez y Quiala, 1998).

En el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar se ha logrado la obtención de embriones somáticos en medios de cultivo en estado semisólido (Guiderdoni, 1986b;

Jiménez, 1995; Gómez, 1996), en agitadores orbitales (Aftab *et al.*, 1996; Falco *et al.*, 1996b; Freire *et al.*, 1999). Se obtuvo la regeneración de plantas a partir de embriones somáticos encapsulados en condiciones *in vitro* (Quiala *et al.*, 1998, Tapia *et al.*, 1998) y se han obtenido las primeras plantas a partir de embriones somáticos producidos en biorreactores (de Feria *et al.*, 1999), todo esto forma parte de un programa de semilla artificial cuya etapa final debe culminar con la conversión en fase de aclimatización o campo de embriones somáticos encapsulados, pero para ello se precisa dar solución a una serie de inconvenientes como es la contaminación del endospermo artificial por agentes microbianos.

El hecho de que el endospermo sintético contenga como principal fuente de energía la sacarosa, lo hace un medio

idóneo para el desarrollo de microorganismos. El problema de la contaminación es una de las diferencias que existen entre las semillas sintéticas y las semillas naturales ya que es conocido que estas últimas son capaces de autoprotgerse contra el ataque de microorganismos, ya sea por protección física a través de la elaboración de un compartimento o por la producción de sustancias químicas de efecto antimicrobiano tales como compuestos fenólicos, los cuales abundan en el pericarpio y en la nucela (Sakamoto *et al.*, 1995).

Desde que Redenbaugh *et al.* (1986) sugirieran el uso de fungicidas y antibióticos en el control de contaminantes microbianos de la semilla sintética, diversos autores han descrito el uso frecuente de estos productos para la protección química de la misma, aunque el principal problema de su empleo radica en el efecto fitotóxico que provocan sobre el material vegetal al aplicarse en las concentraciones que controlan los microorganismos. Por otro lado, algunos de ellos, como los antibióticos, son muy caros y su uso eleva el costo de producción de las semillas sintéticas. (Molle *et al.*, 1993).

El 1-(5-bromo-fur-2-il)-2 bromo-2 nitroeteno, conocido comercialmente como Vitrofur, es un compuesto antimicrobiano desarrollado en Cuba, el mismo posee un amplio espectro de acción contra hongos y bacterias. Este producto ha tenido un uso terapéutico efectivo (Blondeau *et al.*, 1999) y ha permitido además el control de contaminantes que se presentan durante la micropropagación de cultivos como plátanos, banano, papa y caña de azúcar en dosis que no sobrepasan los 35 mg. l⁻¹ (Agramonte *et al.*, 1997).

Este trabajo tuvo como objetivo principal estudiar el efecto del Vitrofur en la esterilización química del medio de cultivo de germinación semisólido y en el endospermo sintético de los embriones somáticos de caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de embriones somáticos

Formación de los callos

Se seleccionaron plantas de caña de azúcar en campo de la variedad Cuba 87 – 51 de tres meses de cultivo y sintomatológicamente sanas. A las muestras seleccionadas se le eliminaron las hojas más maduras que envuelven el ápice y posteriormente se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) 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, las mismas fueron fraccionadas en pequeños discos, con un diámetro de 3.0 – 5.0 mm, que contenían las hojas A y B según la clasificación de Guiderdoni y Demarly (1988). Se tomaron los primeros diez discos desde la base del

meristemo hacia arriba y se sembraron en el medio de cultivo propuesto por Payán *et al.* (1977) complementado con 3.0 mg l⁻¹ de 2,4-D y gelificado con 7.0 g.l⁻¹ de agar, en el cual permanecieron durante 21 días.

La composición específica de los medios de cultivo se define en cada experimento, el pH siempre se ajustó a 5.6 previo a la esterilización. Los medios de cultivo semisólidos fueron distribuidos a razón de 30 ml en frascos de cristal de 250 ml de capacidad y esterilizados en autoclave a 121 °C de temperatura y 1.2 kg.cm⁻² de presión durante 20 minutos.

Multiplicación de los callos

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) complementado con 3.0 mg l⁻¹ de 2,4-D y gelificado con 8.0 g.l⁻¹ de agar, en el cual permanecieron durante tres semanas.

Inducción de embriones somáticos

Los callos fueron transferidos al medio cultivo de inducción de embriones compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962) (MS) complementado con 1.0 mg l⁻¹ de 2,4-D, 50.0 ml l⁻¹ de agua de coco, 100 mg l⁻¹ de mioinositol y 8.0% de sacarosa y gelificado con 9.0 g l⁻¹ de agar en el cual permanecieron durante 21 días.

Las etapas de formación, multiplicación de los callos e inducción de los embriones somáticos se desarrollaron en condiciones de oscuridad y 28 ± 2.0 °C de temperatura.

Germinación de embriones somáticos

Para la germinación de los embriones somáticos, los callos con estructuras embriogénicas fueron colocados en el medio de cultivo propuesto por Payán *et al.* (1977) libre de reguladores del crecimiento y se incubaron durante siete días en cámaras de crecimiento con luz solar a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) que osciló entre 100 y 125 μmol.m⁻².s⁻¹ y 28 ± 2.0 °C de temperatura. Transcurrido este tiempo los embriones somáticos fueron separados de los callos y utilizados para los experimentos de germinación en medio de cultivo semisólido y de encapsulación.

La germinación fue considerada como el número de embriones somáticos (desnudos o encapsulados) que fueron capaces de emitir hojas y/o raíces bajo condiciones *in vitro* en un término de tres semanas.

Procedimiento de encapsulación

Los embriones somáticos fueron extraídos de los callos en una cabina de flujo laminar con ayuda de pinzas, bisturíes y un microscopio estereoscópico (OLYMPUS),

se colocaron en una mezcla que contenía 2.0% de Alginato de Sodio (Fluka Chemie) y medio de cultivo de germinación. El cual estuvo compuesto por sales MS, 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 100 ml.l⁻¹ de agua de coco y 2.0% de sacarosa. Con ayuda de una micropipeta automática (PIPETTBOY) y una pipeta graduada de 10 ml de capacidad, seccionada en su extremo inferior, se dejaron caer gota a gota 0.5 ml de esta mezcla sobre una solución 110 mM de CaCl₂, asegurando que en cada gota hubiese un embrión. El tiempo de acomplejamiento fue de 15 minutos. Los embriones somáticos encapsulados que se formaron fueron enjuagados con agua desionizada y distribuidos en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad con papel de filtro humedecido con agua desionizada estéril como soporte e incubados en cámaras de crecimiento con luz solar a 28 ± 2.0 °C de temperatura.

Efecto del Vitrofurul sobre la germinación *in vitro* de los embriones somáticos

Los embriones somáticos fueron cultivados en un medio de cultivo semisólido compuesto por sales MS, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 180 ml.l⁻¹ de agua de coco, 2 % de sacarosa y 4.5 g.l⁻¹ de agar. El Vitrofurul fue añadido en diferentes concentraciones (20, 25, 30, 35 y 40 mg.l⁻¹) al medio de cultivo previamente autoclaveado y sin autoclavar. En los tratamientos donde no se autoclaveó el medio de cultivo, los frascos de vidrio de 250 ml empleados fueron enjuagados previamente con una solución de Hipoclorito de Sodio al 0.05%.

Efecto de distintas concentraciones de Vitrofurul sobre la germinación de embriones somáticos encapsulados en perlas de alginato

Se preparó el medio de cultivo líquido (de igual composición que el empleado en el experimento con embriones somáticos desnudos), el cual se distribuyó

a razón de 100ml en Erlenmeyers de 150 ml de capacidad y se dejó ebulir, posteriormente se dejó reposar hasta que la temperatura descendió a 60 °C, seguidamente se adicionaron indistintamente las diferentes concentraciones Vitrofurul (20, 25, 30, 35 y 40 mg.l⁻¹) y finalmente el Alginato de Sodio (2%). La mezcla se dejó reposar 24 horas antes de efectuarse la encapsulación de los embriones somáticos siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Procesamiento estadístico de los datos experimentales

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows, aplicándose la prueba de ANOVA simple en el experimento con embriones somáticos encapsulados y el ANOVA bifactorial para el análisis de los resultados del experimento con embriones somáticos desnudos. Las diferencias entre las medias estadísticas se determinaron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan en ambos experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del Vitrofurul sobre la germinación *in vitro* de los embriones somáticos

El empleo del Vitrofurul resultó efectivo para la esterilización química de los medios de cultivo semisólidos, ya que en ninguno de los tratamientos se manifestó contaminación microbiana. Tanto la dosis aplicada como la forma de aplicación del Vitrofurul influyeron significativamente sobre la germinación. Los mayor germinación se alcanzó cuando se empleó 20 mg.l⁻¹, mientras que disminuyó cuando la concentración se elevó por encima de 20 mg.l⁻¹, aunque estos valores de germinación se mantuvieron superiores al control sin Vitrofurul (Figura 1).

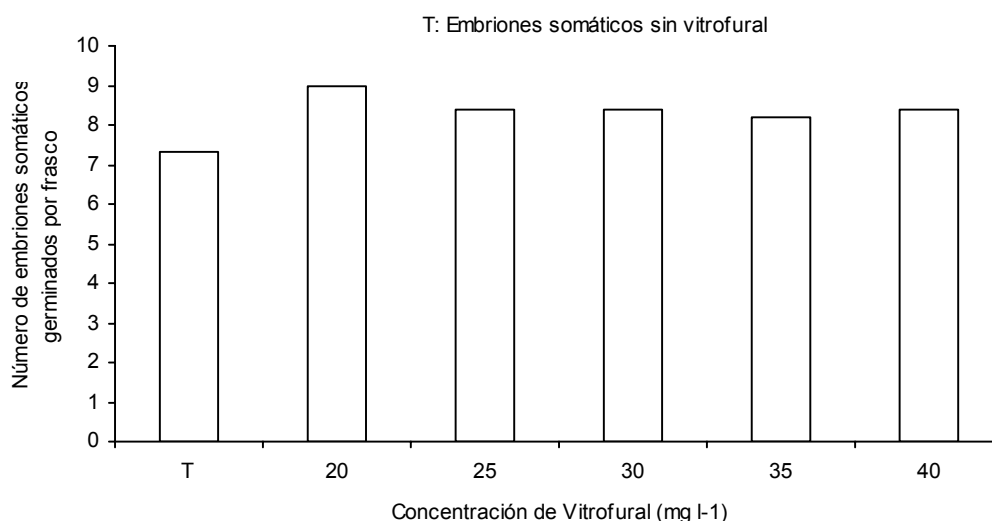
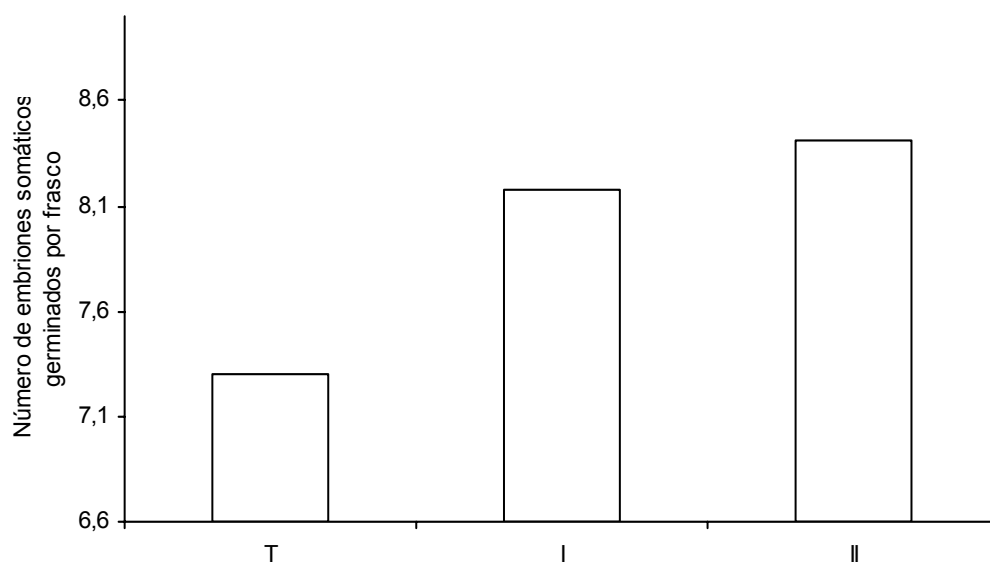


Figura 1. Influencia de la concentración de Vitrofurul en la germinación de embriones somáticos de caña de azúcar var Cuba 87-51 en medio de cultivo semisólido (tercera semana de cultivo).

Al comparar la frecuencia de germinación de los embriones somáticos de aquellos tratamientos donde se aplicó Vitrofurul (Figura 2) con los embriones cultivados en medio de cultivo sin Vitrofurul se pudo observar, que fue mayor en aquellos tratamientos donde se aplicó este producto. Se obtuvo un promedio de 8.41 ESE germinados por frasco (84.1%) cuando no se autoclaveó el medio de cultivo. Durante el autoclaveo el calor provoca efectos negativos sobre los componentes del medio de cultivo, como la degradación de los azúcares, aminoácidos,

reducción de la calidad de los agentes gelificantes (Hurtado, 1987). Por tanto, al no efectuarse el autoclaveo este efecto se minimiza, lo que hace que aumente la estabilidad de los componentes del medio de cultivo y posibilita que los nutrientes sean aprovechados en mayor medida por el material vegetal. El Vitrofurul ha resultado un producto efectivo para la esterilización química de los medios de cultivo, permitiendo eliminar el autoclaveo en la micropropagación a escala comercial de otros cultivos como la papa, banano y piña (Agramonte *et al.*, 1997).



T: Control con embriones somáticos en medio de cultivo semisólido sin Vitrofurul.

I: Embriones somáticos cultivados en medio de cultivo semisólido previamente autoclaveado y con Vitrofurul.

II: Embriones somáticos cultivados en medio de cultivo semisólido sin autoclavear y con Vitrofurul.

Figura 2. Efecto de la aplicación de Vitrofurul en el medio de cultivo semisólido sobre la germinación de los embriones somáticos de caña de azúcar var C 87-51 (tercera semana de cultivo).

Efecto de distintas concentraciones de Vitrofurul sobre la germinación de embriones somáticos encapsulados en perlas de alginato

El Vitrofurul evitó el ataque de agentes microbianos a la cápsula, ya que no se encontró contaminación en ninguno de los tratamientos. En el endospermo sintético se pudo emplear hasta 30 mg l⁻¹ sin que se afectara la germinación y se obtuvo de 8.5 – 8.0 ESE germinados por frasco (85 – 80%) (Figura 3). Cuando la concentración de Vitrofurul en el endospermo fue superior a 30 mg. l⁻¹ la germinación disminuyó entre un 6.6 y 6.3 ESE germinados por frasco (66 - 63%), con resultados inferiores a los tratamientos con embriones somáticos desnudos sin Vitrofurul la cual fue en este último de 7.3 (73%) (Figura 4).

Al comparar estos resultados en los embriones somáticos encapsulados con los obtenidos en los embriones somáticos desnudos del experimento

anterior, se encontró que concentraciones superiores a 20 mg. l⁻¹ hubo afectación de la germinación, lo cual no ocurrió así en los embriones encapsulados donde se pudo llegar a emplear hasta 30 mg. l⁻¹. Estas diferencias, pueden tener su causa fundamental en que la concentración del Vitrofurul no es la misma que la añadida inicialmente al medio de cultivo de encapsulación, sino que esta es menor debido, posiblemente, a la difusión de este producto a través de la matriz de alginato. Autores como Redenbaugh *et al.* (1987a) han señalado como elemento negativo de esta matriz su alta permeabilidad, lo cual se ha podido observar en este trabajo ya que a medida que ocurrió el proceso de acomplejamiento la solución de CaCl₂ (solución incolora) se tornó amarilla (coloración típica del Vitrofurul), con lo cual la concentración final del Vitrofurul en la cápsula concluido el tiempo de acomplejamiento fue posiblemente menor que la añadida inicialmente.



Figura 3. Plantas regeneradas de embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar var Cuba 87-51 con 20 mg.l⁻¹ de Virofural (tres semanas de cultivo).

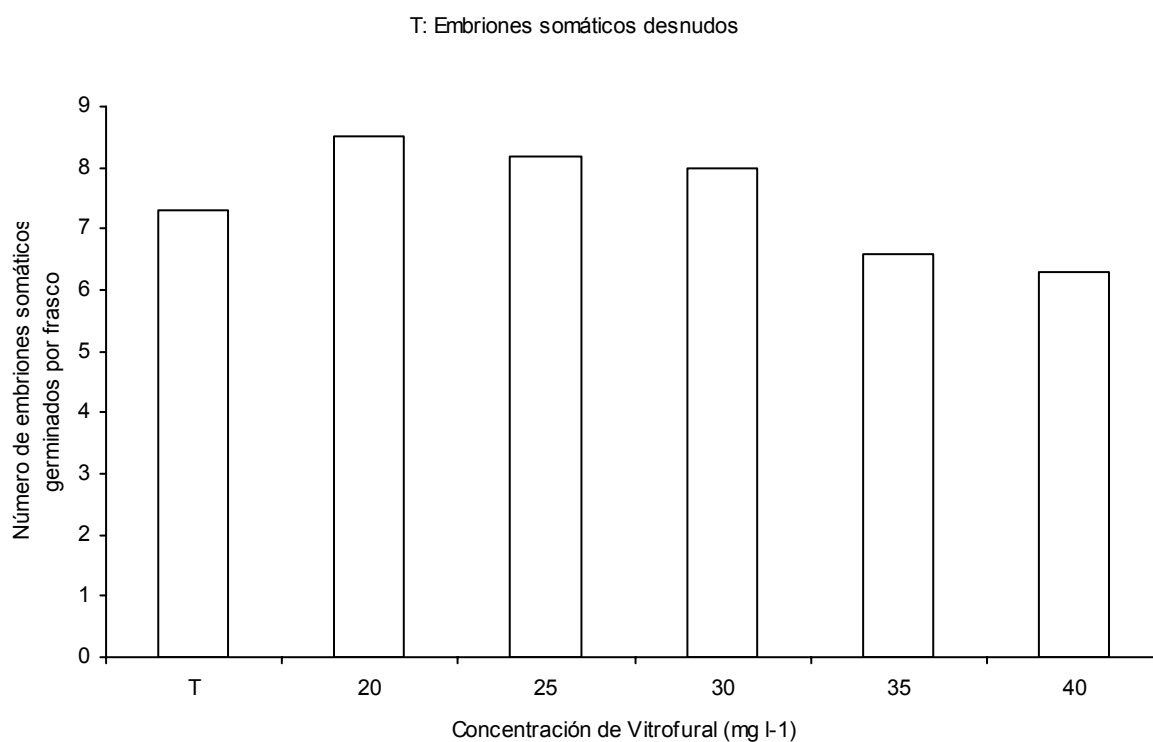


Figura 4. Influencia de la concentración de Virofural en la germinación de los embriones somáticos encapsulados de caña de azúcar var C 87-51 (tercera semana de cultivo).

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, se pudo concluir, que el Virofural puede ser empleado eficientemente en la esterilización química tanto de los medios de cultivos semisólidos de germinación de embriones como del endospermo sintético de los embriones

somáticos encapsulados de caña de azúcar, ya que no solo fue capaz de controlar los contaminantes, sino que la aplicación de este trajo consigo una serie de ventajas como fue la posibilidad de reducir la cantidad de agentes gelificantes. Por otro lado se simplificó además el proceso de encapsulación el cual se pudo realizar en condiciones no estériles.

REFERENCIAS

- Aftab, F, Zafar Y Malik, K A, Iqbal J (1996) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplast in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid cv. Col-54). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44: 71-78
- Agramonte, D, Jiménez F A, Pérez M, Gutiérrez O, Ramírez D, Pérez J, Alvarado Y, Castañedo N, Díaz G, Martín E L, Salazar E y Machado R (1997) Empleo de sustancias de acción antimicrobianas en la esterilización de los medios de cultivo en la micropropagación *in vitro* de la papa (*Solanum tuberosum* L.). En: Técnicas de Avanzada Aplicadas a la Propagación Masiva de Plantas BIOVEG'97. Libro de Resúmenes. Ciego de Ávila, Cuba. p. 121
- Blondeau, J M, Castañedo N, González O, Medina R, Silveira E (1999) *In vitro* evaluation of G-1: a novel antimicrobial compound. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11(2): 163-166
- Falco, M C, Januzzi B M, Tulmann A (1996b) Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 8 (1), pp. 1 – 6
- Freire, M, Gómez R, Herrera I, Reyez M (1999) Embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp híbrido) empleando medios líquidos. En: Libro de reportes cortos: V Coloquio Internacional Biotecnología de Las Plantas. Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Cuba. pp. 118 – 119
- Gómez, R (1996) Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*Ustilago scitaminea* Syd) de la caña de azúcar (*Saccharum* sp híbrido). Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas. Cuba. p. 98
- Guiderdoni, E (1986a) L'Embryogenese somatique des explants foliaires de canne a sucre (*Saccharum* spp) cultivés *in vitro*. Etude anatomique de la morphogenese. *L'AgronomieTropicale*. 41, pp. 160 – 165.
- Guiderdoni, E, Demarly Y (1988) Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.14: 71 – 88
- Heinz, D J, Mee G W P (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci.* 9: 346-348
- Hurtado, M D (1987) Cultivo de tejidos Vegetales. Marino M (ed). Editorial Trillas, Abril. pp. 5 – 8
- Jiménez, E, de Feria M (1998) Empleo de Biorreactores para la Propagación Masiva. En: J N Pérez (ed). Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. pp. 225 – 240
- Jiménez, E, Quiala E (1998) Semilla Artificial. En: J N Pérez (ed) Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. pp. 225 – 240
- Molle, F, Dupuis J M, Ducos J P, Anselm A, Crolus-Savidan I, Petiard V y G Freyssinet (1993) Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. En: Redenbaugh, K (Ed.), Synseeds. Application of Synthetic Seed to Crop Improvement. CRC Press. pp. 257 – 287
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473 – 497
- 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*. 37: 43 – 79
- Quiala, E, Jiménez E, de Feria M, Barbón R, Chávez M, Capote A (1997) Encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp). En: Libro de Resúmenes. Técnicas de Avanzada Aplicadas a la Propagación Masiva de Plantas. BIOVEG'97. Ciego de Avila, Cuba.
- Redenbaugh, K, Paash B D, Nichol J W, Kossler M E, Viss P R, Walker K A (1986) Somatic seed encapsulation of sexual plant embryos. *Bio/technology*. 4: 797
- Redenbaugh, K, Slade D, Viss P, Fujii J A (1987a) Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience*. 22, pp. 803 – 807
- Sakamoto, Y, Noboru O y T Hirosawa (1995) Delivery systems for tissue culture by encapsulation. En: Yenny Aitken-Christie, Tokoyi Kozai, Mary Ann Lila Smith (Eds). Automation and environmental control in plant tissue culture. pp. 215 – 243
- Tapia, R, Nieves N, Blanco M A, Castillo R y A González (1998) Determinación de la capacidad de difusión de la matriz de alginato de sodio para la encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar. En: Libro de Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REBIO 98. p 28