

DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE MBOCAYÁ

Castillo de Meier Graciela MSc.; Romano Martin Ing. Ftal.; Noguera Mercedes¹; Noguera Graciela¹; Franco Silvia¹; Meier Ana¹ (1) Estudiante; Vega, María MSc. Laboratorio Biotecnología de Plantas (BIOLAB). Dirección electrónica: biolab@unf.edu.ar. Universidad Nacional de Formosa, Avda. Gutnisky 3200, Formosa, Argentina

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos es una técnica utilizada para superar la dormancia de semillas, estudiar aspectos nutricionales y fisiológicos del desarrollo de embriones, recuperar híbridos incompatibles y como fuente de explantes con tejidos de elevada totipotencia. En este trabajo, se evaluó el efecto de 3 tratamientos con carbón activado adicionado al medio de cultivo y el efecto de la luz en la incubación en la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de mbocayá [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) LODD ex Mart.]. Se sembraron *in vitro* embriones de frutos maduros de plantas adultas de poblaciones naturales de la localidad de Mojón de Fierro, Formosa, Argentina. Las almedras, que contenían los embriones, fueron desinfectadas en cámara de flujo laminar y los embriones maduros fueron inoculados en posición horizontal en tubos de ensayo que contenían 15 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0,1, 3 o 5 g/L de carbón activado. El pH del medio fue ajustado a $5,8 \pm 0,1$ y 5% de agar antes de esterilización en autoclave a 121 °C y 1 atm. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ con fotoperíodo de 16 h e intensidad luminosa de $42 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, o en oscuridad durante 14 días. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado. La germinación se produjo después de los 60 días y, si bien no existen diferencias significativas entre los tratamientos con carbón activado, el tratamiento de MS más 3 g/L de carbón activado ofreció mayor porcentaje de germinación (93,3%). Los resultados obtenidos mostraron que las condiciones de luminosidad en la incubación no afectaron la germinación.

INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación por el calentamiento global debido, en gran parte, a la emisión de gases de efecto invernadero ha generado la implementación de políticas públicas destinadas a mitigar los efectos del cambio climático (IPCC, 2007). Para tal fin, se ha consensuado en sustituir los combustibles fósiles que producen grandes cantidades de gases perjudiciales para el ambiente por otra alternativa factible, como la utilización de especies vegetales con derivados ricos en aceites aptos para la producción de biodiesel, por ser renovables y biodegradables. Entre las especies de plantas capaces de producir materia prima para su producción se encuentran las palmeras, como la *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius, comúnmente conocida como mbocayá, la cual presenta una amplia distribución en el continente americano, incluido México, las Antillas, Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay (Soares *et al.*, 2011).

Se han realizado numerosas investigaciones en la especie, entre ellas las referidas al estudio de las concentraciones de sales y de agua de coco adicionada

al medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962); pruebas para romper la latencia de semillas; o las condiciones del cultivo de embriones cigóticos maduros e inmaduros, como el fotoperiodo de la incubación y la presencia o ausencia de carbón activado, o de reguladores de crecimiento en el medio MS (Soares *et al.*, 2011; Fogaça *et al.*, 2008; Bandeira, 2008; Silva *et al.*, 2008; Fogaça *et al.*, 2009). También se ha expuesto que el mbocayá puede ser una opción para la obtención de aceites y carbón; esto se debe a su gran potencial energético. Presenta acentuada variabilidad genética y alta dificultad en la germinación (Silva *et al.*, 2008). Ante la imposibilidad de propagar genotipos superiores a través de técnicas convencionales por no poseer meristemas axilares (Ledo *et al.*, 2001). El cultivo de embriones *in vitro* posibilita acelerar el proceso germinativo y el desarrollo de las plántulas (Tzec Sima *et al.*, 2006) y se transforma en una alternativa para la propagación de especies que presentan dormancia de sus semillas (García *et al.*, 2002; Tzec Sima *et al.*, 2006) con la finalidad de obtener plántulas uniformes y libres de patógenos (Soares *et al.*, 2011).

Considerando la importancia de la propagación *in vitro* de mbocayá como cultivo comercial en la provincia de Formosa, se formuló el presente trabajo con el objetivo de evaluar el efecto de las distintas concentraciones de carbón activado adicionadas al medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y el efecto de la luz en la incubación de embriones cigóticos para la obtención de vitroplantas.

MATERIALES Y MÉTODO

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (BIOLAB), dependiente de la Facultad de Recursos Naturales y Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Formosa, Argentina.

Fueron utilizados como fuente de explantes, frutos maduros cosechados de cuatro plantas adultas de poblaciones naturales existentes en la localidad de Mojón de Fierro, provincia de Formosa, en diciembre de 2010.

Doscientos frutos fueron almacenados en bolsas de arpillera, en un cobertizo y a temperatura ambiente. Después de 16 horas, se les eliminó el pericarpio de la fruta y el endocarpio, lo que permitió liberar la almendra que contiene en su interior el embrión cigótico.

Las almendras, fueron desinfectadas en inmersión: (a) solución 1% de lavandina comercial (hipoclorito de sodio al 5%) durante 24 horas; (b) en cabina de flujo laminar: solución de etanol al 70% durante 2 minutos; (c) solución 2% de lavandina comercial (hipoclorito de sodio al 5%) más dos gotas de Tween 20, durante 20 minutos en agitación; (d) tres enjuagues con agua destilada estéril.

Los embriones maduros fueron inoculados en posición horizontal en tubos de ensayo que contenían 15 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962), complementado con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, vitaminas, MS con (0,1; 3 y 5 g/l) de carbón activado, 3% de sacarosa. El pH del medio fue ajustado a 5,8 ± 0,1 y 7 g/l de agar antes de esterilización en autoclave a 121 °C y 1 atm durante 20 minutos.

Los tratamientos consistieron en la combinación de 2 regímenes de incubación de los explantes en sala de crecimiento, con temperatura de 27 °C ± 2 °C, con ambiente oscuro durante 14 días desde el inicio del cultivo y el otro, con un fotoperiodo de 16 h luz con una irradiación de 42 μmol x m⁻² s⁻¹ (con lámparas fluorescentes luz de día L 30 W/765 marca OSRAM), con 4 tratamientos, 3 con carbón activado (1, 3, 5 g.L⁻¹) y uno con MS solo. Luego de los 14 días, los

explantes mantenidos en oscuridad pasaron a las condiciones de luz descritas anteriormente.

El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado, en un esquema factorial 2 x 4 (2 regímenes de incubación de los explantes por 4 tratamientos) y se utilizó el *software* estadístico InfoStat, versión 2004. Fueron realizadas 3 repeticiones por tratamiento y 10 embriones por repetición.

Las observaciones fueron realizadas luego de los 60 días del cultivo. Las variables que se contabilizaron fueron: número de embriones germinados, número de embriones sin respuesta (oxidados) y número de embriones contaminados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de los embriones que fueron establecidos *in vitro*, solo se perdieron por contaminación entre el 0 y 16 %, lo que indica que el protocolo de desinfección fue eficiente en la asepsia de las almendras.

En el análisis de los datos no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los 3 tratamientos con MS y 1, 3 o 5 g/l de carbón activado, pero se observaron diferencias significativas al ser comparados con MS sin la adición de carbón activado, en la germinación de embriones cigóticos. Pasados 60 días del cultivo, cuando los explantes eran incubados con un fotoperiodo de 16 h luz, en el medio MS solo, se produjo la germinación de un 53,3% de los embriones. Los mejores porcentajes (93,3%) se observaron en MS más 3 g/l de carbón activado (Figura 1). El mayor porcentaje de explantes que no ofrecieron respuesta (oxidados) fueron en el medio MS sin carbón activado en un 43,4%, que disminuyó a un 3,3% a medida que se aumentaron los g/l de carbón activado.

Los explantes incubados con 14 días de oscuridad inicial no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los 3 tratamientos con MS y 1, 3 o 5 g/l de carbón activado, y también se observaron diferencias significativas al ser comparados con MS sin la adición de carbón activado, en la germinación de embriones cigóticos. Luego de 60 días, ofrecieron una menor respuesta los explantes cultivados en el medio MS sin la adición de carbón activado (36,6%) y la mayor respuesta se dio en MS más 3 g/l de carbón activado (80%) (Figura 1). La mayoría de los explantes que no ofrecieron respuesta fueron los de MS sin carbón activado (46,6%), que disminuyó a un 13,3% a medida que se aumentó los g/l de carbón activado.

Si bien no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre la incubación con fotoperiodo de 16 h y con 14 días de oscuridad inicial, los mejores porcentajes de germinación (93,3%) se dan con fotoperiodo 16 h mientras que un 80% se dio con 14 días de oscuridad, ambos en MS más 3 g/l de carbón activado (Figura 1).

Los datos obtenidos en la germinación de embriones cigóticos *in vitro* concuerdan parcialmente con los de Bandeira (2008), quien evaluó el régimen de incubación y el carbón activado adicionado al medio de embriones cigóticos de *Acrocomia aculeata*. Bandeira concluyó que el fotoperiodo de 16 h proporciona mayores índices de oxidación si se lo compara con una oscuridad inicial de 30 días. En el presente trabajo, no existen diferencias significativas entre las incubaciones utilizadas: resultados con fotoperiodo de 16 h (93,3%) y con 14 días de oscuridad (80%). Coincidimos que el medio MS más 3 g/l de carbón activado es el que ofrece mayores porcentajes de germinación y que a medida que se aumenta el carbón activado en el medio disminuyen los explantes oxidados.

Los resultados en cuanto a la germinación de embriones cigóticos son superiores a los obtenidos por Silva *et al.* (2008), que solo lograron un 33% de tasa germinativa sin carbón activado y con 16 h de fotoperiodo. En cambio, Soares *et al.* (2008) obtuvieron un mayor porcentaje de germinación (95,6%) con un fotoperiodo de 16 h y Fogaça *et al.* (2009) lograron un 78% de germinación con la adición al medio MS de ácido 2-naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) con una concentración de 1,0 mg/l y 0,5 mg/l.

CONCLUSIÓN

Los resultados anteriormente expuestos permiten inferir que la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de mbocayá es superior en el medio MS más 3 g/l de carbón activado incubados con fotoperiodo de 16 h.

La propagación *in vitro* de mbocayá, a través del cultivo de embriones cigóticos, demuestra ser eficaz para la obtención de plántulas. Por lo tanto, se deduce que es una técnica promisoría para el cultivo extensivo de la especie.

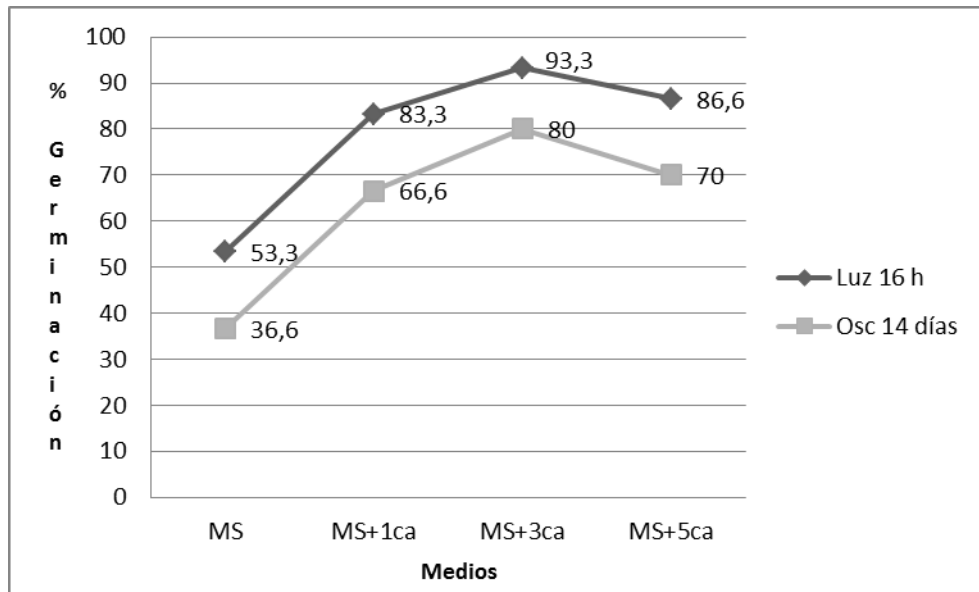


Figura 1. Efecto del carbón activado adicionado al medio MS y la luz en la incubación en el porcentaje de embriones cigóticos germinados. Resultados a los 60 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandeira, F. (2008). Cultivo in vitro e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. 2008. 92p. Tesis de Doctorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Brasil.
- Fogaça, C.; Rocha Monteiro de Andrade, S.; Cargnin, A.; Vilela Junqueira, N. (2008). Propagación in vitro de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) via resgate embriões zigóticos". IX Simpósio Nacional Cerrado. II Simposio Internacional Savanas Tropicais. 12 a 17 octubre 2008. Perla Mundi. Brasil.
- Fogaça, C.; Rocha Monteiro de Andrade, S.; Cargnin, A.; Vilela Junqueira, N. (2009). Cultivo in vitro de embriões zigóticos de macaúba". XII Congresso Brasileiro de Fisiología Vegetal "Desafios para la producao de alimentos y bioenergía" 7 a 12 setembro 2009 – Fortaleza – Brasil
- Garcia J.; Troncoso J.; Sarmiento R.; Troncoso A (2002) Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *PlantCell, Tissue and Organ Culture*, 69:95-100.
- Ledo, A., Lameira, O.; Benbadis, A.; de Menezes, I.; Ledo, C.; Oliveira, M. (2001). Cultura in vitro de embriões zigóticos de açazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.23, n.3, p.468-472.
- IPCC (2007). Painle Intergovernamental sobre mudanç as climaticas. Mudancas climáticas em 2007. Disponible en: <http://www.ipcc.ch>
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Ribeiro, L.; Neves, S.; Silva, P.; Andrade, I. (2011). Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento in vitro de coquinho-azedo. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 58, n.2, p. 133-139, mar/abr, 2011, Brasil
- Silva, L. ; Santos, T. ; Almeida, C. ; Figueredo, C.; Almeida, M. (2008). Germinação e seleção de microplantas para estabelecimento de jardim clonal de macaúba (*Acrocomia aculeata*). In: 16 Simpósio Internacional De Iniciação Científica da USP, 2008, Piracicaba, Ribeirão Preto.. Anais do 16 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2008. Disponible:<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/16Siicusp/2714.pdf>
- Soares, J.; Rodrigues, F.; Pasqual, M.; Nunes, C.; Araujo, A. (2011). Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online. ISSN 0103-8478
- Tzec-Simá, M.; Orellana, R.; Robert, M. (2006). In vitro rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart.,

potentially useful native palms from the Yucatan peninsula (Mexico). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v.42, p.54-58

ABREVIATURAS

ANA	ácido 2-naftalenacético
atm.	Atmósfera
BA	Benciladenina
μmol	Micromol
g	Gramo
h	Hora
kg	Kilogramo
l	Litro
m	Metro
m ²	metro cuadrado
ml	Mililitro
mg	Miligramo
MS	medio de Murashige y Skoog 1962
$p \leq$	Probabilidad menor o igual
W	watts
°C	Grados Celsius