

Encapsulación de ápices de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) en perlas de alginato. Influencia del AIB y el MH-5

Encapsulation of apexes of eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) in alginate beads. It influences of IBA and the MH-5

Nadina Nieves, Kirenia Rodríguez, Mariela Cid, Yarianne Lezcano, Romelio Rodríguez y Marcos Daquinta.

Lab. de Células y Tejidos, Centro Bioplantas, UNICA, Carr. a Morón km 9, CP 69450, Ciego de Avila, Cuba.

E-mail: nnieves@bioplantas.cu

RESUMEN. En la actualidad se reporta la semilla artificial a partir de yemas y ápices en la conservación de germoplasma de especies forestales, frutales y embriones somáticos de cítricos, así como ornamentales, plantas medicinales y otros cultivos. El objetivo del trabajo fue evaluar la respuesta a la encapsulación de yemas axilares y ápices *in vitro* de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*). Se trabajó con plantas *in vitro* provenientes de yemas axilares y ápices de árboles adultos de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) cultivados en campo. Las que fueron escindidas en condiciones estériles y encapsuladas en gel de alginato de calcio enriquecido con el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) con los siguientes tratamientos: Control sin encapsular, control encapsulado y tratamientos con MH-5 (análogo de brasinoesteroides) a 0,01 mg/L y AIB (ácido indol butírico) a 1,0 mg/L y 3,0 mg/L. Los tratamientos de AIB (1 mg/L y 3 mg/L) fueron los que presentaron los mejores resultados en cuanto a germinación, tanto en ápices como en yemas axilares. Mientras que sólo el AIB indujo formación de raíces en los órganos encapsulados, aunque esto se logró solamente en los ápices, los cuales, a su vez, también produjeron callos. Los porcentajes más bajos en todos los indicadores evaluados se encontraron en el tratamiento con MH-5.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, brasinoesteroide, encapsulación, *Eucalyptus urograndis*, semilla artificial.

ABSTRACT. At the present time one reports the artificial seed from buds and apexes in the conservation of germoplasma of forest species, fruit and somatic embryos of citrus, as well as, ornamentals, medicinal plants and other cultures. The objective of the work is to evaluate the answer to the encapsulation of axillary buds and apexes *in vitro* of Eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*). One worked with axillary buds and apexes of *in vitro* plants of adult trees of Eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) obtained in field conditions. Those that was cut in sterile conditions and encapsulated in gel of calcium alginate enriched with MS (Murashige and Skoog, 1962) basal media with the following treatments: Control without capsule, control encapsulated and treatments with MH-5 (analogue of brassinosteroid) at 0,01 mg/L and IBA (indol butyric acid) 1,0 mg/L and 3,0 mg/L. The IBA treatments (1 mg/L and 3 mg/L) were those that presented the best results as far as germination, as much in apexes as in axillary buds. Whereas only the AIB induced formation of roots in the organs encapsulations, although this was only obtained in the apexes, which, as well, also produced calluses. The lowest percentage in all the evaluated indicators was in the treatment with MH-5.

Key words: *In vitro* culture, brassinosteroid, encapsulation, *Eucalyptus urograndis*, artificial seed.

INTRODUCCIÓN

La tecnología de la semilla sintética o semilla artificial se encuentra dentro de las técnicas más avanzadas en la biotecnología de las plantas. La definición original de una semilla artificial o sintética fue dada por Murashige en 1978, quien la definió como ‘*un embrión somático simple encapsulado*’, o sea, un producto clonal que podría ser manejado y usado como una semilla real para el transporte, el almacenaje y la siembra y que, por tanto, podría

eventualmente crecer, tanto *in vitro* como *ex vitro*, hasta convertir en planta completa.

Inicialmente la semilla sintética se limitó a agregados de embriones somáticos (Kitto and Janick, 1982) o embriones somáticos aislados (Redenbaugh *et al.*, 1984). Bapat *et al.* (1987) propusieron incluir dentro de este concepto la encapsulación de diferentes propágulos derivados *in vitro*, como por

ejemplo, yemas axilares encapsuladas, pero la definición más reciente fue dada por Aitken-Christie *et al.* (1995), quienes consideran la semilla artificial como embriones somáticos, brotes, u otros tejidos encapsulados artificialmente los cuales pueden ser usados para la siembra bajo condiciones *in vitro* o *ex vitro*.

En la actualidad se reporta la semilla artificial a partir de yemas y ápices en la conservación de germoplasma de especies forestales (Maruyama *et al.*, 1997; Gardi *et al.*, 1999) frutales (Capuano *et al.*, 1998; Piccioni, 1997; Micheli *et al.* 1998) y embriones somáticos de cítricos (Germaná *et al.*, 1999). Rao *et al.*, (2000) refieren la tecnología de la semilla sintética aplicada a frutales, vegetales, ornamentales, plantas medicinales y otros cultivos. En árboles frutales como la manzana se ha estudiado el encapsulado de explantes unipolares en un programa dirigido hacia la proliferación, el enraizamiento y la elongación con el objetivo del intercambio entre laboratorios y la propagación en viveros. (Piccioni, 1997)

El objetivo del trabajo fue evaluar la respuesta a la encapsulación en perlas de alginato de calcio de yemas axilares y ápices *in vitro* de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con plantas *in vitro* provenientes de yemas axilares y ápices de árboles adultos de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) cultivados en campo según la metodología descrita por Daquinta *et al.* (2000). Las yemas y ápices fueron escindidos en condiciones estériles y encapsulados en gel de alginato de calcio enriquecido con el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) con los tratamientos.

- 1- Control sin encapsular
- 2- Control encapsulado
- 3- MH-5 0,01 mg/L
- 4- AIB 1,0 mg/L
- 5- AIB 3,0 mg/L

Las dosis del análogo de brasinoesteroides y de AIB se seleccionaron atendiendo a los resultados descritos por Rodríguez (2000) y los tratamientos empleados respondieron a resultados precedentes obtenidos por Piccioni (1997) y Daquinta (2000) en trabajos de cultivo *in vitro*.

Cada tratamiento fue replicado tres veces y cada réplica contó con 10 cápsulas. Las cápsulas se mantuvieron por 20 minutos en cloruro de calcio 10 mg/L y luego se lavaron por 10 minutos en el medio correspondiente para eliminar los excesos de calcio. Se evaluó un control sin encapsular y otro encapsulado carentes del regulador hormonal.

Los tratamientos se mantuvieron en la oscuridad por 6 días a temperatura de $25 \pm 2,0$ °C, posteriormente fueron colocados a similar temperatura y una densidad de flujo de fotones (FFF) de $80 \text{ mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. bajo luz blanca fluorescente con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

A los 15 y 30 días se evaluaron los ápices y yemas que se mantenían verdes, los que murieron, los que crecieron, germinaron y enraizaron, así como la formación de callos y la masa fresca de las plantas obtenidas.

El diseño utilizado en los experimentos fue completamente aleatorizado y el número de repeticiones empleado se expresó en cada uno de ellos. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el Paquete Estadístico Statgraphics (Versión 2.0 para Windows). Los datos obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y en los casos en que se presentaron diferencias estadísticas se procedió a ejecutar el Test de Rangos Múltiples de Duncan ($p0.05$). Los datos porcentuales se transformaron mediante la ecuación $X' = 2\arcsin((x-100)^{0.5})$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 15 días de encapsulados, tanto los ápices como las yemas axilares se mantenían verdes y no se presentaban cápsulas con el órgano necrosado. La mejor respuesta en cuanto al crecimiento y la germinación lo presentaron los tratamientos con AIB, mientras que el tratamiento con MH-5 presentó la menor respuesta, comparado con el control encapsulado. (Tabla 1)

A los 30 días del experimento se mantuvo similar respuesta en todos los tratamientos. El AIB en ambas concentraciones ensayadas es el que presentó los mayores porcentajes de germinación y el tratamiento con el brasinoesteroides (MH-5) los inferiores. Con una respuesta similar para yemas axilares y ápices meristemáticos. Es de señalar que en los tratamientos

Tabla 1. Respuesta de las yemas axilares y ápices de eucalipto encapsulados en perlas de alginato a los 15 días de sometidos a los diferentes tratamientos

Ápices				
Tratamiento	Verdes (%)	Creciendo (%)	Germinadas (%)	Muertas (%)
Control S/E	100	93a	93 a	0
Control Encapsulado	100	53c	32 c	0
MH-5 0.01 mg/L	100	37d	3 d	0
AIB 1 mg/L	100	97a	59 b	0
AIB 3 mg/L	100	76b	57b	0
Significación	NS	* *	**	NS

Yemas axilares				
Tratamiento	Verdes (%)	Creciendo (%)	Germinadas (%)	Muertas (%)
Control S/E	100	87a	67a	0
Control Encap	100	40d	22d	0
MH-5 0.01 mg/L	100	10e	0e	0
AIB 1 mg/L	100	68c	47b	0
AIB 3 mg/L	100	72b	33c	0
Significación	NS	**	**	NS

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias, para un grado de confiabilidad del 5 % para la prueba de Student-Newman-Keuls (n = 20).

con AIB se observó formación de callo en la base de algunas plántulas germinadas, fundamentalmente en las procedentes de yemas axilares. Es de señalar que los tratamientos con AIB, a los 30 días, no sólo habían germinado, sino que presentaban raíces, en el caso de los ápices, mientras que en el resto de los tratamientos y en las yemas axilares no se observó la presencia de las mismas. (Tabla 2)

La encapsulación de órganos unipolares de árboles forestales es una tendencia mundial en los programas de mejoramiento genético, tanto para la conservación del germoplasma como para el intercambio del mismo entre laboratorios y bancos de semilla dedicados a la producción de especies élite. En la actualidad se reporta para árboles forestales por; Maruyama *et al.* (1997); Gardi *et al.* (1999), en frutales por Capuano *et al.* (1998); Piccioni (1997); Micheli *et al.* (1998) y cítricos por Germaná *et al.* (1999). Rao *et al.* (2000) reportan esta tecnología en vegetales, ornamentales, plantas medicinales y otros cultivos.

Nótese en la figura 2 el vigor que presentan algunas plantas obtenidas a partir de los ápices encapsulados, así como la presencia de raíces, un aspecto importante para la adaptación de las mismas a condiciones de invernadero o casas de cultivo.

El tratamiento con la dosis más baja de AIB (1 mg/L) es el que muestra el mejor comportamiento en la germinación y la calidad de las plantas. (Figura 2)

La puesta a punto de esta tecnología para su utilización en especies de forestales tropicales puede ser una herramienta para la propagación de especies de interés genético y comercial.

CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de AIB 1 mg/L y 3 mg/L presentaron los mejores resultados en cuanto a germinación, tanto en ápices como en yemas.

Tabla 2. Respuesta de los ápices y yemas a los 30 días de encapsulados

Ápices							
Tratamientos	Verdes (%)	Crec. (%)	Germ (%)	Muert (%)	Enraiz (%)	Raíces Promed	Plantas con callo (%)
Control S/Encaps.	93a	93a	93a	7d	0c	0c	0c
Control Encaps.	67d	60d	60d	33b	0c	0c	0c
MH-5 0.01 mg/L	41e	41e	41c	59a	0c	0c	0c
AIB 1 mg/L	78c	73c	73c	22c	14a	0.25a	11b
AIB 3 mg/L	83b	83b	83b	17c	3b	0.05b	19a
Significación	**	**	**	**	**	**	**
Yemas axilares							
Control S/Encap	97a	97a	93a	3d	10	0.2	0
Control Encap	54c	44c	44c	46b	0	0	0
MH-5 0.01 mg/L	37d	30d	30d	63a	0	0	0
AIB 1 mg/L	53c	43c	43c	47b	0	0	0
AIB 3 mg/L	77b	63b	63b	23c	0	0	16
Significación	**	**	**	**	-	-	-

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias, para un grado de confiabilidad del 5 % para la prueba de Student-Newman-Keuls (n = 20).

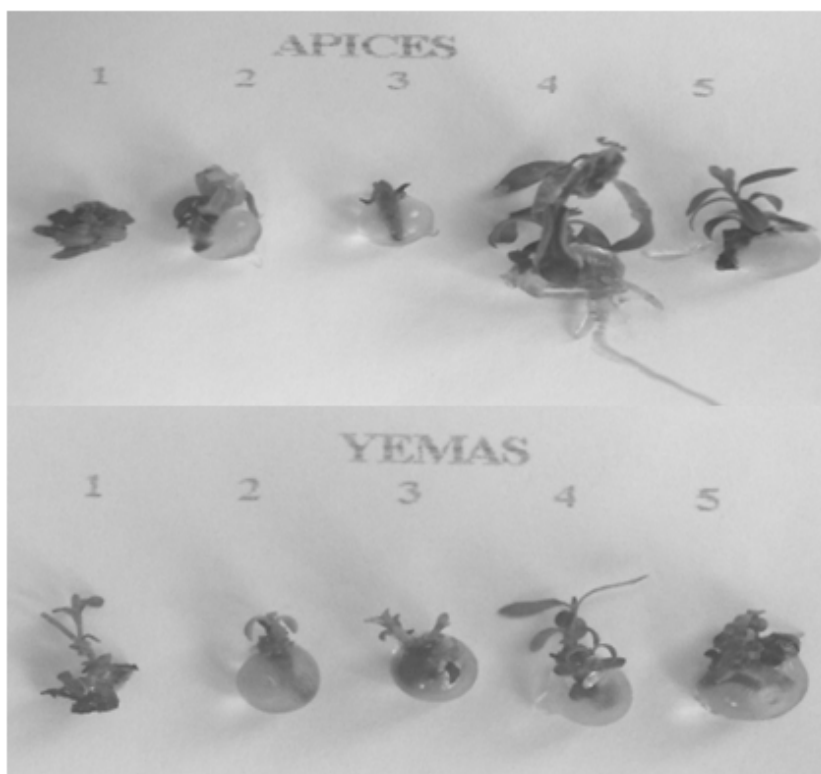


Fig. 1. Ápices y yemas de eucalipto encapsulados en gel de alginato

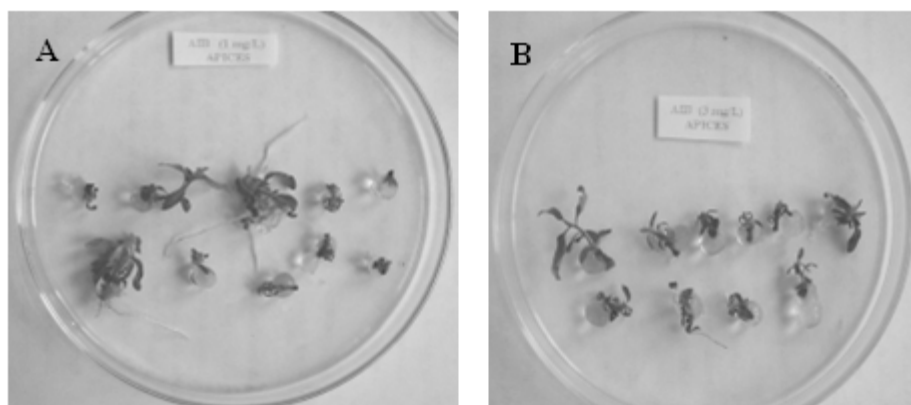


Fig. 2. Aspecto de las plantas a partir de ápices en los dos tratamientos que tuvieron la mejor respuesta. A) AIB 1 mg/L y B) AIB 3 mg/L.

2. Los tratamientos con AIB fueron los únicos que lograron inducir raíces en los órganos encapsulados, aunque esto se logró solamente en los ápices, los cuales, a su vez, también produjeron callos.

3. Los porcentajes más bajos en todos los parámetros evaluados se encontraron en el tratamiento con MH-5.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken-Christie J.; Kozai T. and S. Takayama: Automation in plant tissue cultures - general introduction and overview. In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith M A L (eds) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp., 1-18, 1995.

2. Bapat, V.A.; M. Mhatre and P.S. Rao: "Propagation of *Morus indica* L. (Mulberry) by encapsulated shoot buds". *Pl. Cell Rep.* 6: 393-95, 1987.

3. Capuano, E.P.; E. Piccioni and A. Standardi: "Effect of different treatments on the conversion of M-26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds". *Journal of Hort. Sci and Biot.* 73(3):299-305, 1998.

4. Daquinta, M.; L. Ramos y Y. Lezcano: "Algunos elementos en la micropropagación de la Teca". *Biotecnología Vegetal* 1: 39-44, 2000.

5. Gardi, T.; E. Piccioni and A. Standardi: "Effect of bead nutrient composition on regrowth of stored vitro-derived encapsulated microcuttings of different woody species". *J. Microencapsulation*, 16(1):13-25, 1999.

6. Germaná, M.A.; E. Piccioni and A. Standardi:

"Effects of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco somatic embryo conversion". *Plant, Cell Tissue and Organ Culture.* 55:235-237, 1999.

7. Kitto, S.L. and J. Janick: "Poliox as an artificial seed coat for asexual embryos". *Hort Science* 17, 488 (Abstr. 113), 1982.

8. Maruyama, E.; I. Kinoshita; K. Ishii; K. Ohba and A. Saito: "Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25°C". *Plant Cell Report.* 16:393-396. 1997.

9. Micheli, M.; M. Mencuccini and A. Standardi: "Encapsulation of *in vitro* proliferated buds of olive". *Adv. Hort. Sci.* 12:163-168, 1998.

10. Murashige, T. and F. Skoog: "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". *Physiol Plant.* 15: 473-497, 1962.

11. Piccioni, E.: "Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 47:255-260, 1997.

12. Rao, P.S.; P. Suprasanna and V.A. Bapat: Synthetic seed technology in horticultural crops. Biotech. In Hort. Plant. Crops. Eds. K.L. Chadha, P.N. Ravindran and Leela Sahijram, pp. 32-54, 2000.

13. Redenbaugh, K.; J. Nichol; M. Kossler and M. Paasch: "Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production *in vitro*", *Cell Dev. Biol.* 20: 256, 1984.

Recibido:24/enero/2010

Aceptado: 13/julio/2010