

Evaluación de un agente gelificante cubano, Natugel, en el cultivo *in vitro* de plántulas de tomate

✉ Amelia Capote Rodríguez, Felipe Álvarez Villanueva, Zoila Fundora Mayor, Yamilet Rodríguez Sainz de la Torre, Odalys Pérez Díaz, Damaris Fonseca Acosta

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" INIFAT. Calle 1 esq. 2, Santiago de Las Vegas, Ciudad de La Habana. Teléfono: (53-7) 57 9010.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de un agente gelificante cubano, Natugel, en el crecimiento de cultivos *in vitro* de plántulas de tomate de la variedad Cuba C-2781. Fue de interés demostrar si se afecta o no el crecimiento y si este producto puede ser un sustituto del agar. Se utilizaron como explantes ápices y nudos germinados *in vitro* y cultivados en medio MS con sacarosa y Natugel en dos formulaciones: I y II que se diferencian en la granulometría y en la densidad aparente. Se prepararon cultivos controles con las mismas condiciones anteriores pero con la adición de agar en sustitución del agente gelificante. La respuesta de los cultivos se evaluó en función del número de nudos y la altura de las plántulas en sucesivos subcultivos. Los datos se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza y las diferencias se analizaron por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5%. No se encontraron diferencias significativas entre la respuesta obtenida en medio solidificado con agar y la obtenida en medio solidificado con la mezcla Natugel I/II. Se concluyó que es posible utilizar el producto Natugel en los medios de cultivo de tejido de tomate sin afectar el crecimiento *in vitro*.

Palabras claves: agentes gelificantes, *in vitro*, Natugel, tomate

Biotecnología Aplicada 2002;19:37-40

ABSTRACT

Evaluation of a Cuban Gelling Agent, Natugel, in *In Vitro* Culture of Tomato Plantlets. The effect of the Cuban product Natugel on *in vitro* growth tomato cultures was studied. This product could be a possible substitute of agar as gelling agent in culture media, in plant tissue culture. Apices and nodes from *in vitro* germinated plantlets were used, derived from Cuba C-2781 variety cultured in a modified MS medium with different formulations of Natugel; a control with agar (7 g/L) was considered. The response of cultures was evaluated as a function of the number of nodes and plantlets length in successive subcultures. Data were statistically evaluated by means of an analysis of variance, and the differences among mean values were analyzed using a multiple random Duncan test at 5%. No significant differences were noted between the response obtained in agar medium and the medium with a I/II Natugel mixture. Results showed that it is possible to use Natugel in tomato tissue culture medium without affecting *in vitro* growth.

Keywords: gelling agents, *in vitro*, Natugel, tomato

Introducción

El establecimiento de un sistema de cultivo de tejidos conlleva elaborar un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los requerimientos nutricionales de la especie vegetal y su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos que lo componen como del agente gelificante [1].

El agar, producto natural extraído a partir de algas rojas, especialmente *Gelidium amansii*, en una concentración de 0,6 a 0,8%, constituye el agente gelificante más comúnmente utilizado; sin embargo, contiene muchas impurezas que pueden alterar las características químicas y físicas del medio y afectar directamente los tejidos y células cultivados [2, 3]. El agar no siempre es útil como agente gelificante pues además de estas impurezas existen otros inconvenientes como son las fluctuaciones del pH de hasta una unidad durante y después de la esterilización en autoclave, inducción de hiperhidricidad y respuestas fisiológicas diferentes que son un reflejo de la disponibilidad del agua y los nutrientes en los diferentes medios de cultivo. Por todas estas razones se ha propuesto el uso de otros compuestos como el *Gelcarin* (carragenina extraída de las algas rojas *Eucheuma*), que evita grandes cambios de pH, produce un gel claro y evita la vitrificación en plantas susceptibles [4].

El empleo de la carragenina como agente gelificante en los cultivos de tejidos vegetales fue descrito en 1986 por Ichi y colaboradores los cuales plantearon que de acuerdo a sus resultados los tejidos crecieron mejor sobre este gel que cuando el medio se solidificó con agar [5]. En la actualidad la producción de carragenina a nivel mundial descansa sobre el cultivo de las algas rojas, ricas en polisacáridos sulfatados como el agar y los carragenanos que aparecen en su pared celular, los cuales le confieren su mayor importancia económica [6].

De igual forma se ha extendido cada vez más el uso de Gelrite, un heteropolisacárido producido por la bacteria *Pseudomonas elodea*, el cual produce un gel claro adecuado para la observación de los cultivos y es de menor costo por litro de medio [7]. En la búsqueda de alternativas para la sustitución del agar se han evaluado otros agentes gelificantes como la agarosa, el alginato [8], el almidón en los cultivos de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota*, L.) [9], celulosa en especies de *Brassica* [10] y más recientemente la harina obtenida de los rizomas de sagú (*Maranta arundinacea*, L.) para la micropropagación de especies de importancia económica como *Orthosiphon aristatus*, *Menta piperita* y *Menta arvensis* [11], entre otras.

1. Lorz H, Larking PJ, Scrowcroft WR. Improved protoplast culture and agarose media. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1983;2:217-26.

2. Kohlembach HW, Wernicke W. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z Pflanzenphysiol* 1978;86:463-72.

3. Singha S, Townsend EC, Oberly GH. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentration of three commercial agars. *J Amer Soc Hort Sci* 1985;110:407-11.

4. Danesh M, Cluley G, Tajji A. Media pH is affected by gelling agent, charcoal, plant growth regulators and autoclaving. In: Tajji A, Williams R, editors. *Tissue culture: toward the next century*. Univ New England: New England Publications; 1997. p.209-15.

5. Ichi T, Koda T, Asai I, Hatanaka A, Sekieja J. Effect of gelling agents on *in vitro* culture of plant tissues. *Agric Biol Chem* 1986; 50:2397-9.

6. Valdés O. Un recurso con potencialidades insospechadas. Las algas marinas. *Flora y Fauna* 1999;3(1):30-4.

7. George EF. *Plant propagation by tissue culture*. Part 1. The technology. Edington Wilts: Exegetics Ltd;1993.

En el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), de La Habana, Cuba, se han desarrollado, a partir del alga marina *Kappaphycus alvarezii*, los productos naturales Natugel como agentes formadores de geles y se han descrito sus procedimientos de utilización en diferentes áreas de investigación [12]. En general, la utilización de agentes gelificantes obliga a actuar cuidadosamente pues según el tipo y concentración, pueden variar considerablemente los sistemas de cultivo, entre ellos la inducción y crecimiento de las plántulas [7].

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos formulaciones del producto Natugel en el crecimiento de los cultivos *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) para demostrar si se afecta o no este crecimiento y validar el producto como posible sustituto del agar en los medios de cultivo.

Materiales y Métodos

El material vegetal que se utilizó fueron nudos (*nd*) y ápices (*ap*) de plántulas de tomate (*L. esculentum*, Mill.) cv. Cuba C-2781, los cuales se cultivaron *in vitro* en medio MS [7] con la adición de 30 g/L de sacarosa.

Las características del producto Natugel como agente gelificante se evaluaron de forma cualitativa por la turbidez y consistencia que confiere a los medios de cultivo, y cuantitativa por su efecto sobre la respuesta de los tejidos cultivados *in vitro*: el número de nudos y la altura de las plántulas (cm) obtenidas en cada subcultivo. Estos indicadores son, por tanto, las variables de respuesta.

La investigación se diseñó en dos etapas. En la primera se comparó el crecimiento del material vegetal en el medio descrito anteriormente con la adición de Natugel I a una concentración de 27,5 g/L con el crecimiento en otro medio pero con la adición de agar a una concentración de 7 g/L, en sustitución del agente gelificante. El medio que contiene agar se asumió como control. Las concentraciones de Natugel y de agar son equivalentes. En esta etapa, se exploró con esta concentración de agar para precisar si era necesario incrementarla o disminuirla.

Posteriormente, en una segunda etapa de trabajo, se emplearon dos formulaciones diferentes del producto: Natugel I, Natugel II y una mezcla de ambos, Natugel I/II, al 50% de cada uno. Se comparó el crecimiento del material vegetal en los medios obtenidos con la adición de cada producto respectivamente y el medio de control, en este caso, con agar al 4%. La concentración de Natugel en todas sus formulaciones fue de 24,83 g/L y es equivalente a la concentración del agar. Las diferencias entre ambas formulaciones del producto radican en la granulometría, de 1 a 2 mm para la I y de 0,02 a 0,1 mm para la II y en su densidad aparente, 538 g/L y 489 g/L respectivamente [12].

La concentración de Natugel se calculó por la medición de la consistencia (g/cm^3) de un cilindro de gel de área conocida mediante el método propuesto por Establier [13], donde se encontró que existe una correlación directa entre la concentración y la consistencia del gel con un coeficiente de determinación mayor de 0,95; como referencia se tomaron las concentraciones

de agar más frecuentemente empleadas en los medios de cultivo [12].

Los cultivos se desarrollaron en un fotoperíodo de 14 horas luz y a una temperatura de 25 ± 2 °C. En la primera etapa los resultados se evaluaron a los 30 días de cultivo y en la segunda etapa se realizaron tres subcultivos cada 30 días y los resultados se evaluaron al final de cada uno para conocer el comportamiento del material vegetal en un período más largo de cultivo.

En cada etapa se evaluaron un total de seis réplicas por variante con tres repeticiones, los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA, y las diferencias analizadas por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5%.

En todos los casos el pH de los medios fue ajustado a 5,8 en un pH metro digital modelo MV 780 (PRÁCITRONIC, Alemania), antes de añadir los agentes gelificantes utilizados. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1,2 atm de presión, durante 20 min.

Los contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio de Natugel se determinaron por el método de digestión ácida en medio sulfónico-peróxido [12].

Resultados y Discusión

En los medios solidificados con Natugel, en ambas formulaciones, se observó que la turbidez obtenida no fue excesiva para el cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*. Esto es un aspecto importante si se tiene en cuenta que es necesario observar las posibles contaminaciones para su eliminación. El producto Natugel, a pesar de dar una coloración más amarillenta a los medios de cultivo, mantiene la transparencia necesaria. La consistencia del gel formado por el Natugel I, fue mayor que la del Natugel II.

Se encontró que los contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio fueron extremadamente bajos ($\text{N} = 0,0084\%$, $\text{P} = 0,006\%$ y $\text{K} = 0,013\%$), por lo que no fue necesario realizar ningún ajuste en los medios de cultivo [12].

Los resultados obtenidos en la primera etapa indicaron que tanto el número de nudos como la altura de las plántulas en ambos explantes, fueron menores en los cultivos con Natugel I en comparación con los de agar pero significativamente menor para la variable altura y para el número de nudos cuando se utilizaron *ap* como explantes (Figura 1). Esta respuesta pudiera deberse a que la consistencia del gel no permitió la libre difusión de los nutrientes, lo que repercutió en el crecimiento de los explantes en los medios de cultivo aunque en menor cuantía para el explante *nd*. Se planteó que un incremento de la viscosidad del medio puede afectar la eficiencia de los cultivos de tejidos vegetales porque altera la velocidad de difusión de los nutrientes, y por ende, la disponibilidad de los componentes [3].

En relación con este aspecto está publicado que la absorción de iones inorgánicos tales como los nitratos por las plántulas obtenidas es menor cuando crecen en medios solidificados con agentes gelificantes, entre ellos, el agar que cuando lo hacen en medios líquidos [14]. Al disminuir la concentración de Natugel en ambas formulaciones a 4 g/L, los resultados muestran que la consistencia ahora obtenida es adecuada para el óptimo desarrollo de los cultivos de tejidos *in vitro*. La selec-

8. Szabados L, Nuñez VM, Tello LM, Maffa G, Roca J, Roca WM. Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. In: Roca WM, Mroginski LA, editors. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT; 1991. p.80-93.

9. Henderson WE, Kinnersley AM. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. Plant Cell Tissue Organ Culture 1988;15:17-22.

10. George J, Hofer E, Leike H, Dautzenberg HF, Loth F. The use of a novel stabilizing substrate for the *in vitro* cultivation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). Plant Cell Rep 1983;2:189-91.

11. Fuentes V, Castro M, Ordaz D. Sustitución de agar por polvo de rizomas de sagú (*Maranta aristatus*) en cultivo *in vitro* de té de riñón (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.). 1991; Informe final, INIFAT, Ciudad Habana. p.6.

12. Álvarez FC, Arecas A, Gutiérrez L. Sustitución del agar en medios de cultivos. XII Forum Ciencia y Técnica INIFAT. Junio 10, 1997; Ciudad Habana, Cuba, p.15.

13. Establier R. Variación de la composición química, extracción y características del agar-agar de algunas algas de la costa sub-atlántica española. Investigaciones Pesqueras 1964;26:165-94.

14. Faye M, David A, Lamant A. Nitrate reductase activity and nitrate accumulation in *in vitro*-produced axillary shoots, plantlets and seedlings of *Pinus pinaster*. Plant Cell Rep 1986;5:368-71.

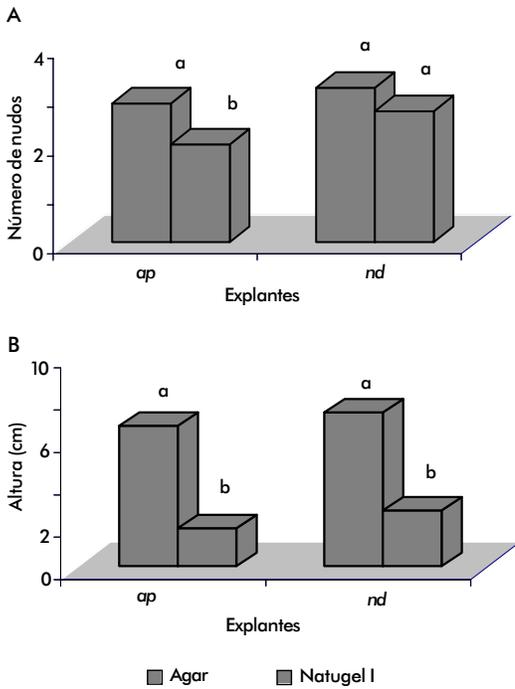


Figura 1. Efecto de la utilización del producto Natugel I sobre diferentes explantes. Control: un medio solidificado con agar 7%, ap (ápices) y nd (nudos). Los valores representan la media de tres repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente entre sí.

ción de una adecuada concentración del agente gelificante es sumamente importante ya que evita la inducción de hiperhidricidad dada por la presencia de hojas deformadas, de color verde intenso y peciolo alargados, así como deformaciones estructurales de los estomas [15]. Es importante también porque una inadecuada concentración puede reducir el crecimiento y proliferación de los brotes [16].

Al analizar los resultados obtenidos cuando se empleó como explante *nd* se observó que para ambas variables evaluadas: número de nudos y altura de las plántulas, no se detectaron diferencias significativas entre las variantes Natugel I, Natugel I/II y agar en los dos primeros subcultivos; sin embargo, en el tercer subcultivo el agar se comportó mejor que el resto de los agentes gelificantes. En todos los subcultivos evaluados los valores más bajos se encontraron al utilizar la variante Natugel II (Figura 2).

Con el explante *ap* se observó que en la variable número de nudos no se detectaron diferencias significativas en las respuestas obtenidas en los sucesivos subcultivos en la comparación realizada entre la variante Natugel I/II y el agar; sin embargo, el comportamiento de la variable altura de las plántulas fue diferente, en los primeros dos subcultivos no existieron diferencias significativas y sí se detectaron en el tercer subcultivo (Figura 3). Estos resultados indican que a pesar de haber un incremento en la respuesta en el tercer subcultivo en los medios suplementados con agar, el número de nudos que se obtuvieron durante todo el período de cultivo *in vitro* no varía cuando se compara con los valores obtenidos al gelificar los medios con la mezcla del producto Natugel I/II. Por

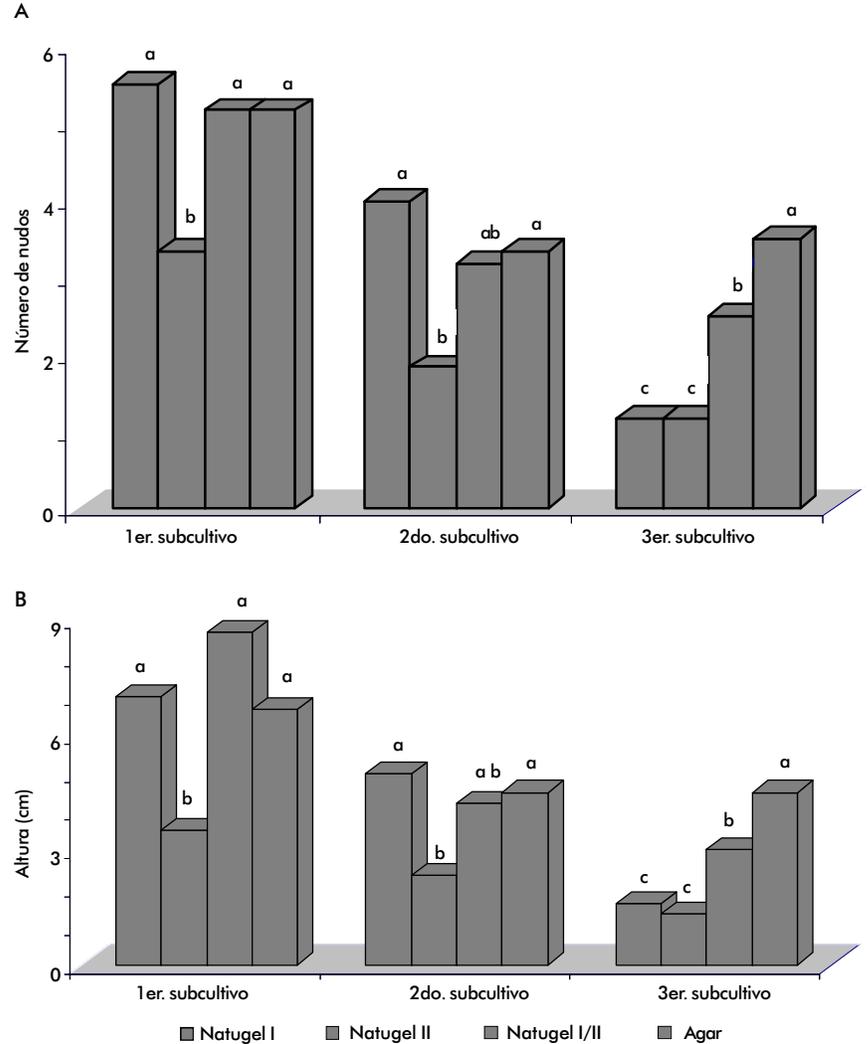


Figura 2. Comportamiento de los indicadores número de nudos y altura de las plántulas en sucesivos subcultivos al utilizar diferentes formulaciones del producto Natugel con el explante *nd*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente entre sí.

tanto esta formulación, como agente gelificante, no afecta la respuesta que se obtiene en el crecimiento *in vitro* de las plántulas de tomate (Figura 4).

Resultados similares fueron obtenidos en estudios anteriores realizados por Szabados y colaboradores cuando compararon el efecto de diferentes agentes gelificantes en los cultivos *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta*) si bien diferencias significativas en el peso fresco y la longitud de los brotes no se encontraron en el número de nudos, por lo tanto el tipo de agente empleado no afectó la velocidad final de propagación. Sin embargo se plantea en otros casos, una inhibición de la inducción de yemas axilares con el tipo de agente gelificante utilizado como en *Ranunculus asiaticus*, con la consiguiente afectación en la propagación clonal de esta especie [15].

Conclusiones

- Es posible utilizar el producto cubano Natugel como agente gelificante en los medios de cultivo de tejido.

15. Beruto M, Curir P, Debergh P. Influence of agar on *in vitro* cultures. II. Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 1999;35:94-101.

16. Ziv M. Vitrificación: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh PC, Zimmerman RH, editores. *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers; 1991. p.45-69.

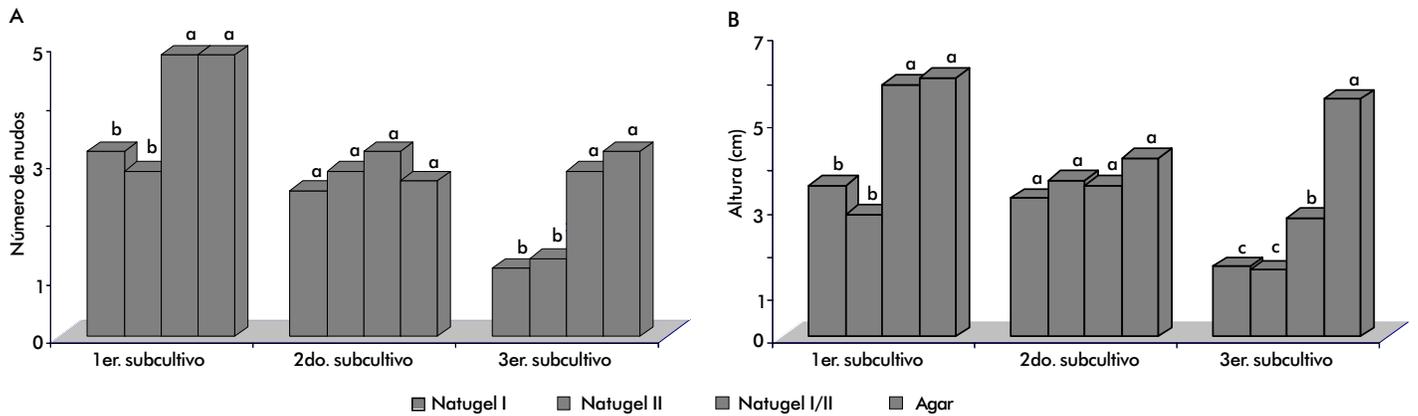


Figura 3. Comportamiento de los indicadores números de nudos y altura de las plántulas en sucesivos subcultivos al utilizar diferentes formulaciones del producto Natugel con el explante ap. Los valores representan la media de tres repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente entre sí.

dos de tomate cv. Cuba C-2781, sin afectar la respuesta obtenida *in vitro*.

- La cantidad de producto Natugel a utilizar es de 24,83 g/L de medio, concentración equivalente a 4 g/L de agar.
- Las mejores respuestas se obtuvieron cuando se utilizó la mezcla de Natugel I/II (1:1 m/m), ya que el número de nudos no difiere significativamente del que se obtiene cuando se solidifican los medios con agar. Existió un comportamiento similar en la respuesta obtenida para ambos explantes utilizados.

Recomendaciones

Debido a la importancia que implica contar con un agente gelificante cubano que pueda sustituir al agar en los medios de cultivo, se propone continuar estos estudios con el objetivo de testar el Natugel en otros sistemas *in vitro* como la callogénesis y regeneración de plantas, en otros cultivares de tomate, así como en otras especies de importancia económica.

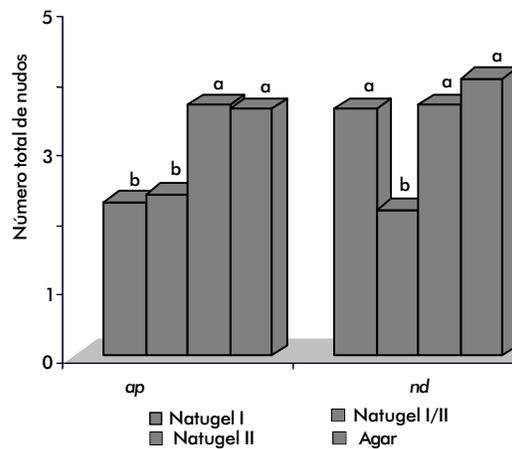


Figura 4. Número total de nudos obtenidos durante todo el período de cultivo *in vitro* en las diferentes variantes estudiadas con el explante nd. Letras iguales no difieren significativamente entre sí.