

Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.)

Control of oxidation and contamination of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) cultivated *in vitro*.

Maria Claudia Sánchez-Cuevas* y José Luis Salaverría

Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Agronomía, Escuela de Ingeniería Agronómica, Núcleo de Monagas, Universidad de Oriente, Maturín. E-mail:mariaclaudia@cantv.net. *Autor para correspondencia

RESUMEN

La fresa es cultivada en casi todo el mundo, no solamente por sus características digestivas y tónicas, sino por el valor nutritivo de sus frutos, fuente importante de folato, vitamina C, fibra, potasio, flavonoides, antocianidina, fitoquímicos y antioxidantes. Las experiencias de la micropropagación en fresas indican que las vitroplantas son más uniformes, presentan un mayor número de estolones, tienen una mayor sobrevivencia en el campo y el rendimiento de frutos se incrementa en un 24% que las plantas propagadas por el método tradicional. Es indispensable evitar la contaminación con microorganismos para lograr éxito en el establecimiento, incubación y manipulación del tejido *in vitro*, ya que éstos pueden destruir los explantes, retrasar su desarrollo al competir con ellos o generar modificaciones en el medio que afectan negativamente su sobrevivencia y desarrollo. La contaminación puede provenir del tejido vegetal o ser introducida durante la manipulación del tejido. En los primeros intentos por establecer explantes de fresa *in vitro* se observó una alta contaminación por hongos y bacterias, a más del ennegrecimiento de algunos cultivares. En el presente trabajo se evaluó el efecto del tiempo de inmersión (10, 20 y 30 min) y tres concentraciones (10, 20 y 30%) de cloro comercial (5,25% de hipoclorito de sodio) en la desinfección de explantes de fresa cv. Fresno. El tratamiento 20 min en cloro comercial al 20% mostró la menor contaminación y la mayor sobrevivencia de los explantes, y mayor formación de brotes. La oxidación de los explantes del cv. Aiko fue completamente eliminada con la adición de cisteína (4 g/l) en presencia de luz, permitiendo la sobrevivencia del 100% de los explantes.

Palabras clave: Fresa, cultivo de tejidos, contaminación, oxidación, desinfección

ABSTRACT

Strawberry is cultivated all around the world, not only for its digestive and tonic properties, but because of the nutritional value of its fruits, important source of folate, vitamin C, fiber, potassium, flavonoids, antocianidin, phytochemicals and antioxidants. Prior experiences with strawberry micropropagation indicate that vitroplants are more uniform, produce higher number of runners, have better survival in the field, and the fruit yield increases in 24% than plants propagated by the traditional method. It is necessary to avoid the contamination with microorganisms in order to achieve success in the establishment, incubation and manipulation of the tissue *in vitro*, since contaminants can destroy the explants, delay their development by competing with them or generate changes in the culture medium that negatively affect their survival and growth. Contamination can come from the explant or can be introduced during the manipulation of plant tissue. In the initial attempts to introduce strawberry plants to *in vitro* conditions, a high contamination by fungi and bacteria was observed, besides tissue blackening in some cultivars. In the present work, disinfection of the strawberry explants cv. Fresno was done by means of immersion of the shoots in the plant crown in commercial chlorine (sodium hypochlorite, 5.25%) for different time intervals (10, 20 and 30 min) and various chlorine concentrations (10, 20 and 30%). The best treatment was 20% chlorine with a 20 min immersion time, which better reduced the contamination, allowing a greater survival of the explants and a higher shoot formation. The treatment that reduced more efficiently tissue oxidation was cystein (4 g/l) with light, which allowed 100% explant survival.

Key words: Strawberry, tissue culture, contamination, tissue oxidation, disinfection.

INTRODUCCIÓN

La fresa, una planta pequeña de la familia Rosaceae, se cultiva en Venezuela en pequeñas plantaciones, con una producción baja a pesar de la

gran demanda que siempre ha tenido, tanto para el consumo fresco como para el uso industrial. Las condiciones agroecológicas del Municipio Caripe del estado Monagas son aptas para el desarrollo del cultivo: altitud de 1100 msnm, temperatura promedio

anual de 25 °C y una precipitación media anual de 1200 mm. En esta zona se produjeron cerca de 200 tn de fresa entre 1972 y 1974, pero actualmente la producción ha disminuido drásticamente debido a la escasez de material importado de siembra, a que las variedades sembradas no son las más adecuadas y a que existen plagas que afectan negativamente al cultivo (Ávila, 1986). La planta de fresa se propaga exclusivamente en forma asexual, por lo que existe gran diseminación de virus, micoplasmas, nemátodos y hongos. Estos problemas se han agudizado por la dificultad de detectar estos patógenos ya que muchas plantas enfermas son asintomáticas, a la introducción de cultivares susceptibles, al intercambio internacional y a las nuevas técnicas de siembra (Boxus *et al.*, 1977).

Las plantas de fresa procedentes de cultivo de tejidos producen mayor número de estolones que las plantas propagadas por los métodos tradicionales (Boxus *et al.*, 1984), son más uniformes y sobreviven más en el campo (Swartz y Lindstrom, 1986). Experiencias llevadas a cabo en Venezuela señalan que las plantas micropropagadas poseen un excelente vigor y una óptima producción de estolones y frutos en el campo (FUSAGRI, 1984).

Los explantes para el cultivo de tejidos de fresa pueden provenir de la corona o de los estolones, aunque es más fácil la extracción y la desinfección de los explantes de los estolones (Villegas, 1990). La alta pubescencia de los tejidos y su contacto directo con el suelo inducen una alta contaminación de los explantes, especialmente cuando éstos son extraídos de plantas provenientes del campo (Villalobos y Pérez, 1979). Estos contaminantes pueden ocasionar la muerte de los tejidos, competir con ellos o modificar el medio (Mroginski y Roca, 1991). Existen diversas técnicas para el control de la contaminación *in vitro*, tales como el uso de fungicidas y antibióticos en la planta madre, el explante y/o el medio de cultivo; sin embargo, no se recomienda la adición de antibióticos al medio para controlar la contaminación bacteriana porque no son efectivos en la mayoría de los casos (Pierik, 1987), aunque algunos autores señalan que su adición es necesaria cuando el tejido tiene infecciones sistémicas (Phillips *et al.*, 1981). Ocasionalmente ocurre el ennegrecimiento del tejido, con posterior necrosis del explante. Para evitarlo se sugiere disminuir la intensidad de la luz, agregar antioxidantes al medio y el explante, subcultivar con frecuencia, incrementar las sales de calcio, reducir el nivel de nitrato en el medio y sumergir el explante en

medio líquido por un día (Swartz y Lindstrom, 1986).

El objetivo de este trabajo fue evaluar procedimientos de desinfección superficial con hipoclorito de sodio y el uso de antioxidantes durante el establecimiento *in vitro* de explantes de fresa, para controlar la contaminación y el ennegrecimiento de los tejidos de los cv. Fresno y Aiko.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los explantes fueron extraídos de plantas procedentes de siembras comerciales ubicadas en La Guanota y San Agustín, Municipio Caripe del estado Monagas. Las yemas extraídas de la corona, de unos 5 mm de longitud, fueron lavadas tres veces, durante 5 min, con agua corriente y unas gotas de jabón líquido lavaplatos. Las yemas del cv Fresno fueron sumergidas en alcohol 70% durante 10s, después en una solución de cloro comercial (5,25% de hipoclorito de sodio) en tres concentraciones (10, 20 y 30%), durante tres períodos de inmersión (10, 20 y 30 min) y finalmente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Los explantes, constituídos por el domo meristemático y 2 ó 3 primordios foliares, se sembraron en tubos de ensayo en 10ml del medio nutritivo de Boxus (1977), y se incubaron a una temperatura de 24 ±2 °C y un fotoperíodo de 12 hr luz. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado en arreglo factorial 3 x 3, con 10 repeticiones. La evaluación de los porcentajes de contaminación, sobrevivencia y número de brotes se realizó 20 días después del establecimiento del ensayo.

En el ensayo de antioxidantes, los explantes del cv. Aiko fueron desinfectados con una solución de cloro comercial (5,25% de hipoclorito de sodio) al 20% durante 20min. A cada explante se le agregó, previo a la siembra, los antioxidantes: cisteína (4 g/l), ácido cítrico (150 mg/l) + ácido ascórbico (150 mg/l) o polivinilpirrolidona (5 y 10%). Los explantes sembrados en el medio de Boxus (1977) fueron sometidos a oscuridad completa o a 12 hr/luz y 12 hr/oscuridad. Cada tratamiento estaba compuesto por 16 explantes, en un diseño estadístico completamente aleatorizado con 4 repeticiones. Las diferencias entre los porcentajes de sobrevivencia, evaluada 8 días después de la siembra, se realizaron mediante la prueba de Sokal y Rohlf.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la evaluación de contaminación se observó que a medida que se aumentaron la concentración de cloro comercial y el tiempo de inmersión, la contaminación de los explantes disminuyó (Figura 1). Los menores porcentajes de contaminación se obtuvieron con 20 y 30% de cloro comercial y períodos de inmersión de 20 y 30 min. En el tratamiento con 30% de cloro y 30 min de inmersión,

a pesar de no haber habido contaminación, la sobrevivencia fue de tan solo el 50%, lo que indica que este tratamiento fue tóxico para los explantes. El mayor porcentaje de sobrevivencia se obtuvo con el tratamiento compuesto por cloro 20% y 20 min de inmersión.

A los 20 días después de la siembra (DDS), el tratamiento de cloro comercial al 20% registró el

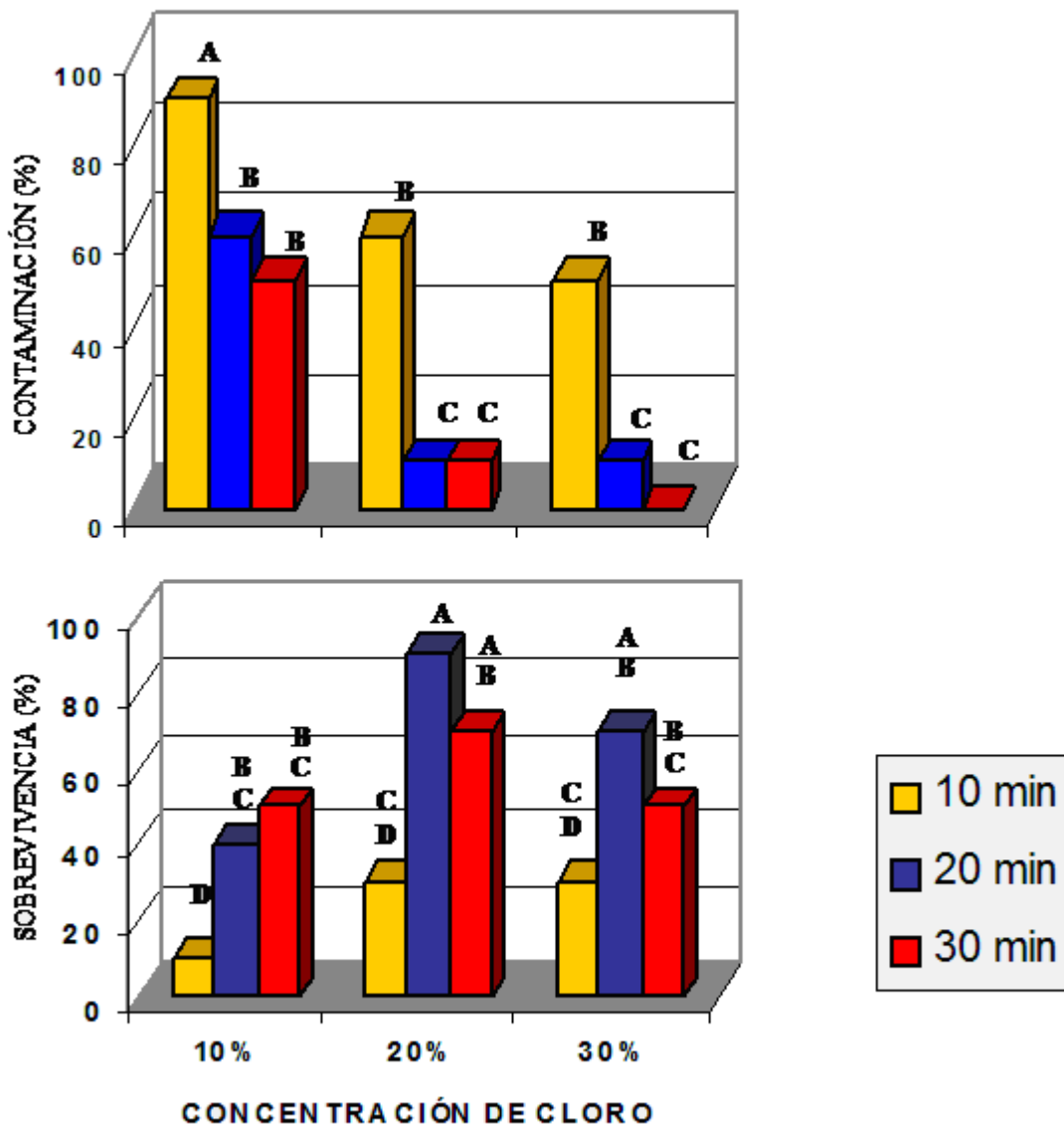


Figura 1. Efecto de la concentración de cloro comercial (5,25% hipoclorito de sodio) y el tiempo de inmersión en los porcentajes de contaminación y sobrevivencia de los explantes de fresa, 20 días después de la siembra. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($\alpha \leq 0,05$)

mayor número de brotes por explante, sin diferencias significativas con la máxima dosis (Figura 2). Estos resultados indicaron que el mejor comportamiento de los explantes se obtuvo al desinfectarlos con cloro comercial al 20% durante 20min. Otros investigadores también han utilizado cloro para desinfectar tejidos de fresa. Dodds y Roberts (1985) recomiendan desinfectar con 10% de cloro (0,5% de hipoclorito de sodio), mientras que Bhojwani y Razdan (1983) señalaron que una concentración de 0,3 a 0,6% de hipoclorito de sodio durante 15min a 30min es suficiente para descontaminar la mayoría de los tejidos. También se ha recomendado tener cuidado con la dosis del desinfectante y el tiempo de inmersión seleccionados, pues todos los desinfectantes son tóxicos para el tejido. Otro factor a tomar en cuenta es la pubescencia del tejido. Villalobos y Pérez (1979) señalaron que, si el tejido es pubescente, debe hacerse un prelavado con detergente o etanol 70% durante 30s para romper la tensión superficial y hacer la superficie más accesible a la acción de los agentes desinfectantes. Otros autores han utilizado exitosamente el cloro en cultivos en los que la contaminación y la fenolización del tejido dificultan el establecimiento de los explantes (Romero, 2000a; Romero, 2000b).

La aplicación de antioxidantes tuvo un efecto muy marcado en la sobrevivencia de los explantes de fresa cv Aiko. Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento de cisteína (4 g/l) en

presencia de luz, seguidos por el control con luz, cisteína (4 g/l) sin luz y la mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico (AC + AA) sin luz, en los cuales se observó un 50% de sobrevivencia (Figura 3). La cisteína, de acuerdo con George y Sherrington (1984), no previene la oxidación, sino que actúa en la rápida remoción de cualquier quinona que se forma. Además, como es un aminoácido, pudo haber inducido un rápido desarrollo de los explantes al ofrecer nitrógeno orgánico rápidamente disponible para suplir sus requerimientos. Los explantes tratados con polivinilpirrolidona (PVP) en dosis de 5% (con y sin luz) y 10% sin luz no sobrevivieron, así como los que no recibieron antioxidante alguno y permanecieron en la oscuridad (control sin luz). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Sánchez-Cuevas y otros (2001), quienes lograron obtener los mejores resultados de sobrevivencia de 80% de explantes de pimentero, libres de oxidación, con la adición de PVP (0,5 y 1,0 g/l) en presencia de luz.

De acuerdo con Davies y Creasy, citados por George y Sherrington (1984), las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja.

En este experimento, los resultados indicaron

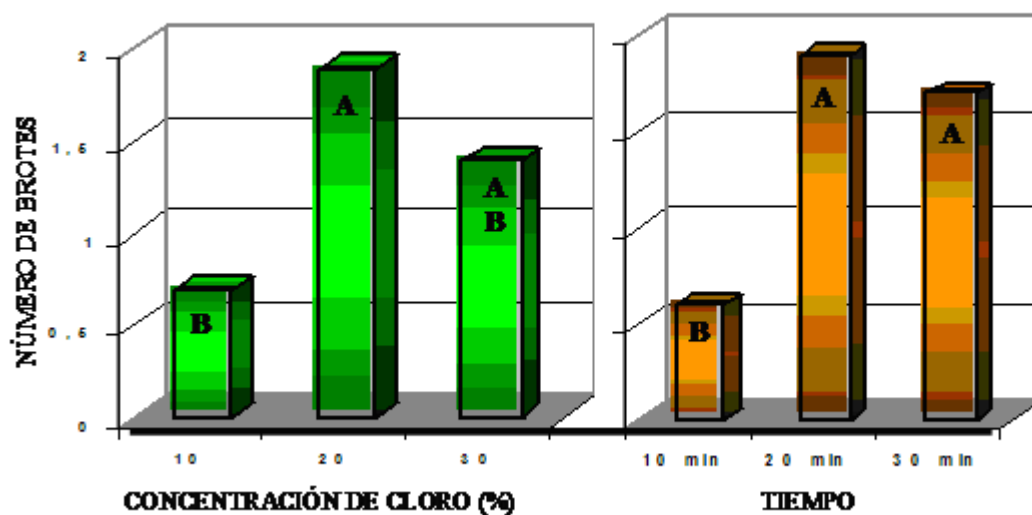


Figura 2. Efecto de la concentración de cloro y del tiempo de inmersión en el número de brotes formados en explantes de fresa cv Fresno, 20 días después de la siembra. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($\alpha \leq 0,05$)

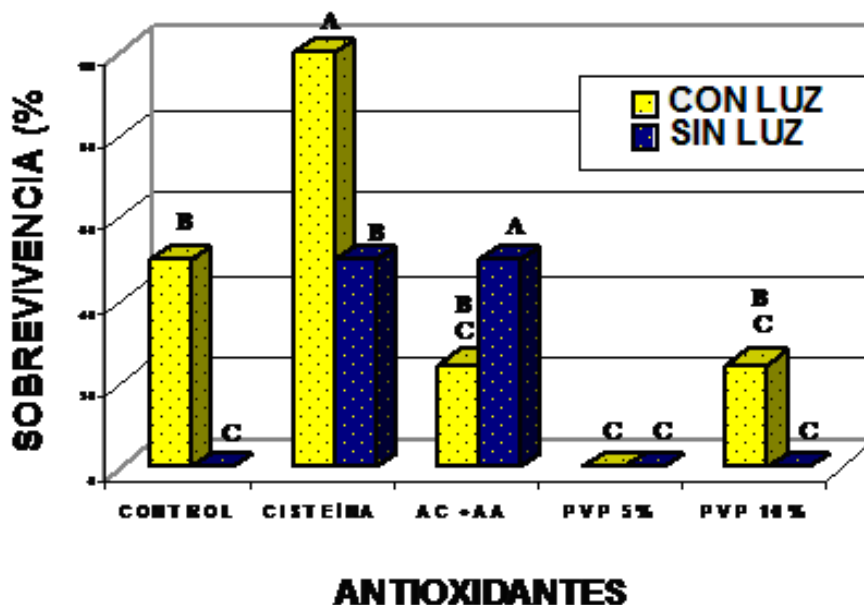


Figura 3. Efecto de la presencia o ausencia de luz y de los antioxidantes Cisteína, ácido cítrico (AC) + ácido ascórbico (AA) y polivinilpirrolidona (PVP) en la sobrevivencia de explantes de fresa cv “Aiko”. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($\alpha \leq 0,05$)

que la sobrevivencia de los explantes disminuyó en ausencia de luz, con o sin la adición de antioxidantes, excepto en los explantes que recibieron la adición de AC + AA. Así mismo, a pesar de George y Sherrington (1984) indican que en ápices de *Malus* la adición de la poliamida PVP fue esencial para la sobrevivencia de los explantes, al remover los componentes fenólicos, en fresa la mortalidad de los explantes fue muy alta cuando se añadió PVP, probablemente porque las concentraciones empleadas hayan sido muy altas. Por último, no es frecuente observar oxidación de tejidos en fresa y son pocos los cultivares que presentan ennegrecimiento (Villalobos y Pérez, 1979).

CONCLUSIONES

La alta contaminación por hongos y bacterias de los explantes, generada por la procedencia de las plantas directamente del campo, el contacto directo de las yemas con el suelo por su ubicación en la corona (cuello de la planta) y por la gran pubescencia del tejido de fresa, fue controlada efectivamente con la inmersión de los explantes en una solución de cloro 20% durante 20 min. Concentraciones más altas o períodos de inmersión más prolongados causaron necrosis en el tejido. El tratamiento de los explantes con cloro 20% y 20 min de inmersión indujeron la

mayor formación de brotes (1,8 brotes).

La oxidación fenólica de los tejidos de fresa cv Aiko se redujo con la adición de cisteína (4 g/l) directamente al explante antes de la siembra, manteniendo el tejido en presencia de luz.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de esta investigación al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente.

LITERATURA CITADA

- Ávila O, P. 1986. Respuesta de la fresa (*Fragaria* sp cv. “Aiko”) a los días cortos y a la aplicación de melaza como medios para mejorar la calidad de los estolones. Trabajo de Grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Oriente. Escuela de Ingeniería Agronómica. Maturín, Venezuela. 91 p
- Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture. Theory and Practice. Elsevier. New York. 235 p.

- Boxus, P.; C. Damiano, and E. Brasseur. 1984. Strawberry. *In*: P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp, and Y. Yamada (EDS). Handbook of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol 3. Macmillan. New York. p. 453-486.
- Boxus, P.; M. Quoirin, and M. Laine. 1977. Large Scale Propagation of Strawberry Plants from Tissue Culture. *In*: J. Reinert, and P. S. Bajaj (EDS). Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag. New York. p 131-206.
- Dodds J. H. and L. W. Roberts. 1985. Experiments in Plant Tissue Culture. 2nd ed. Cambridge University Press. London. 232 p.
- Fundación Servicio para el Agricultor (FUSAGRI). 1984. Producción de plantas de fresa por cultivo de tejidos. Noticias agrícolas. Estación Experimental de Cagua, Cagua, Estado Aragua. Vol X (24): 94-96.
- George, E.F. and P. D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics. Eversley, Basingstoke, England. 109 p.
- Mroginski, L. A. y W. M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. *In*: W. M. Roca y L. A., Mroginski. (EDS). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. p 19-40.
- Pierik, R. L. M. 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). 343 p.
- Phillips R.; S. M. Arnott, and S. E. Kaplan. 1981. Antibiotics in Plant Tissue Culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant culture of *Helianthus tuberosus*. Plant Science Letters 21: 235-240.
- Romero, D. 2000a. Una metodología para la desinfección y el control de la oxidación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.). Acta Científica Venezolana 51 (Sup. 2):7.
- Romero, D. 2000b. Control de la oxidación y contaminación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.). Acta Científica Venezolana 51(Sup. 2):7.
- Sánchez-Cuevas, M. C.; R. J. Anés y J. R. Cedeño. 2001. Efecto de varios antioxidantes en la sobrevivencia de explantes de pimentero (*Piper nigrum* L.). Acta Científica Venezolana 52 (Sup. 3): 58.
- Swartz, H. J. and J. T. Lindstrom. 1986. Small fruit and grape tissue culture from 1980 to 1985: Commercialization of the technique. *In*: R. H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag and R. H. Lawson (EDS). Tissue Culture as a plant production system for horticultural crops. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). 201-220 p.
- Villegas, M, A. 1990. Micropropagación de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) *In*: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO. Roma. P 91-95.
- Villalobos V. M. y M. G. Pérez. 1979. Alta producción de plantas de fresa libres de virus a partir del cultivo de meristemos. Proc. Tropical Región ASHS 23:70-72.