

# **Efecto diferencial de tres tratamientos de asepsia en *Cajanus cajan*.**

Montero, Clara, Enilda Macías y Luis Wong-Vega.

Universidad Católica Santa María La Antigua, Dirección de Investigación Universitaria, Laboratorio de Biotecnología.

Abstract.

*Cajanus cajan* (Millsp.) es una especie leguminosa con un alto potencial como fuente nutricional para países del tercer mundo. Su estudio biotecnológico es relativamente reciente y pasa, necesariamente, por el establecimiento de condiciones para el cultivo de su tejidos. Trabajando con materiales locales, hemos probado tres tratamientos distintos, dirigidos a producir plántulas asépticas germinadas in vitro, que sirvan como fuente de tejido joven para ulterior manipulación. De las experiencias realizadas, se observa una correlación inversa entre la tasa total de recuperación de plántulas viables y la cantidad de plántulas limpias de patógenos. Tomando en cuenta que para efectos de manipular estos tejidos el interés primario es el recuperar material aséptico, los resultados demuestran que un tratamiento que combina un antibiótico con un antifúngico comerciales, seguido de una inmersión secuencial del material tratado en hipoclorito de sodio y ácido ascórbico, resultó ser más efectivo en la generación de plántulas asépticas, aún cuando su eficiencia cuantitativa (en término de plántulas vivas recuperadas) sea inferior a los otros métodos.

Justificación. Antecedentes

Los cultivos de *Cajanus cajan* son sujeto de estudio en cuanto a su susceptibilidad para la manipulación organogénica por vía de inducción hormonal. Este conocimiento es imprescindible para encarar su eventual transformación molecular utilizando metodologías del ADN recombinante.

Como paso inicial del proceso de manipulación de los tejidos de *C. cajan*, es fundamental poder producir tejidos iniciales asépticos (por ejemplo, de plántulas jóvenes recién germinadas) totalmente libres de contaminación bacteriana y fúngica.

La no disponibilidad local de semilla comercial certificada y limpia, fuerza al uso de materiales (cv. "criollo") colectados de explotaciones agrícolas a campo abierto, los cuales usualmente poseen un alto grado de infestación endofítica, por distintos tipos de microorganismos (principalmente bacterias y levaduras).

En el presente estudio se ha ensayado algunos procedimientos reportados en trabajos similares ( cita, ), comparándolos con otros cuyo ensayo frente a esta especie que no ha sido reportado previamente, tratando de determinar el

tratamiento de desinfección más idóneo, menos contaminante y menos dañino, en términos de daño tisular al material vegetal tratado.

## **Materiales y Métodos**

Para cada experimento independiente, grupos (n= 20) de semillas de *Cajanus cajan* (cultivar denominado "criollo") fueron germinadas por un total de siete días, en presencia de respectivos tratamientos antisépticos.

Se ensayaron tres distintos tratamientos primarios de desinfección y las semillas tratadas fueron evaluadas al término de una semana. Los tratamientos empleados fueron, a saber:

a) Inmersión de las semillas en mezcla de Benlate 0.3%, Ferban 0.3%, Agrimicin 0.3% por 30 minutos, seguido baño en solución comercial de hipoclorito de sodio (Clorox) al 5.25% por 15 minutos, finalizando con tres enjuagues con agua destilada y desionizada, estéril y una inmersión en ácido cítrico al 0.5% por 30 minutos.

b) Inmersión del explante en Benlate 5% por 6 horas, seguido de baño en Clorox 5.25% por 1 minuto y tres enjuagues sucesivos con agua destilada, desionizada, estéril. Finalmente, inmersión en ácido cítrico 0.5% por 30 minutos.

c) Inmersión en solución de SDS al 0.1% por 15 minutos, seguido de baño en Merthiolate al 0.1% por 5 minutos y serie de cinco enjuagues con agua destilada, desionizada, estéril, sin baño final en ácido cítrico

Secundariamente, las semillas tratadas según estos procedimientos fueron germinadas en algodón humedecido con algunos de los tres agentes siguientes: en presencia de una mezcla de Benlate 0.3%, Ferban 0.3%, Agrimicin 0.3%; en presencia de Benlate al 0.3% únicamente; o en algodón embebido en agua destilada, desionizada, estéril.

La eficacia de cada tratamiento primario y secundario fue evaluada cada día, considerándose positiva, la no aparición de signos externos de crecimiento de los fitopatógenos (ni sobre el material vegetal ni sobre el medio de cultivo), por inspección visual o estereomicroscópica, al término absoluto de la experiencia (dos semanas).

El criterio de selección que se tuvo en cuenta fue el desarrollo de la planta a los 7 días de sembrada. Si alguna planta tenía buen desarrollo, pero presentaba contaminación, no se contabilizaba como positiva. De igual forma, si una semilla germinada estaba libre de contaminación, pero su desarrollo hacia el estado de plántula era notoriamente deficiente o ausente, se descartaba.

Se corrieron diversas series de experimentos, en donde se combinaron tratamientos primarios y secundarios de forma alterna. Cada experimento fue

repetido tres veces, siendo los datos sometidos a un análisis de varianza multifactorial.

## Resultados y Discusión

En la tabla 1 se observa el resultado de los tres tratamientos de asepsia sobre la contaminación así como su efecto en la germinación de las plantas

**Tabla 1**

Tratamiento	A	B	C
Total Sembradas	20	20	20
% de germinación	56%	0	100 %
% contaminación	0	0	18 %

Según estos resultados, el tratamiento "A" fue muy efectivo para controlar la contaminación en general, aunque afectó negativamente la tasa de germinación observada para materiales no tratados, de usualmente alrededor del 100% (observaciones de nuestras experiencias en el laboratorio). El tratamiento "B", por su parte al parecer fue bastante severo y anuló la contaminación endofítica pero al costo de afectar negativamente a la tasa de germinación de las semillas. Por su parte el tratamiento "C" mostró una mejor germinación, prácticamente idéntica a la que se recupera en materiales no-asepticos, aunque presentó de manera consistente un porcentaje importante de contaminación persistente.

Con el fin de corroborar estos resultados y de estudiar el efecto de un tratamiento continuado con antibióticos y antifúngicos sobre los parámetros estudiados (viabilidad y asepsia en los explantes), se preparó una serie de experimentos en donde se compararon nuevamente los tratamientos A y C, pero con la variación de que, en esta ocasión, las semillas fueron germinadas sobre algodón humedecido con una de tres opciones siguientes: a) una solución de Agrimicin + Benlate; b) una solución de Benlate y c) agua estéril. Los resultados se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2**

Medio	Asepsia A			Asepsia C		
	Agr+ Ben	Benlate	Agua	Agr+ Ben	Benlate	Agua
N sembradas	20	20	20	20	20	0
% de germinación	50%	91%	83.3%	83.3%	91.66%	83.3%
contaminación	8.3%	0	25%	0	8.3%	10%

Se observa que la presencia continuada de la mezcla de antifúngicos y antibióticos afecta la tasa de germinación en materiales provenientes de ambos tratamientos de asepsia comparados. Curiosamente, pareciera ser que el Benlate no solo está libre de estos efectos dañinos, sin que posee mejor efecto sobre la tasa de germinación que la simple imbibición de semillas en agua.

En cuanto a los efectos sobre la contaminación misma, Los resultados parecieran contradecirse en ambos grupos: para las semillas tratadas con el tratamiento aséptico A, la germinación en presencia de Benlate elimina la contaminación en general, mientras que en semillas esterilizadas según el tratamiento B, estos mismos resultados (cero contaminación) solo se presentan cuando las semillas son geminadas en presencia de la mezcla combinada de antibiótico y antifúngico.

Estos resultados sugieren que la combinación del tratamiento de asepsia "A", seguida de germinación de las semillas tratadas sobre algodón humedecido con solución de Benlate presenta la mejor alternativa de tratamiento combinado para recuperar una buena relación viabilidad /asepsia.

Los datos de esta experiencia indican que el tratamiento "C" es, probablemente, menos dañino para la germinación de las semillas de *C. cajan* y que afecta en menor grado su viabilidad, pero mantiene un grado de contaminación remanente importante, lo cual lo descarta como una opción útil para el trabajo de manipulación tisular en esta especie.

Con el fin de corroborar los resultados de los dos experimentos anteriores, se ensayaron nuevamente los tratamientos A y C, con la variante de que, en esta nueva serie de ensayos, las semillas fueron germinadas en algodón humedecido con la mezcla de Agrimicín y Benlate, aumentándose la muestra estudiada, tal como se detalla en la Tabla 3:

**Tabla 3**

	Asepsia A	Asepsia C
Total sembradas	36	36
% de germinación	61 %	83.3 %
Contaminación	0	0

Los resultados obtenidos confirman que el tratamiento inicial de asepsia C sobre semillas que son puestas a germinar sobre algodón humedecido en presencia de la mezcla Agrimicín+ Benlate, rinde las mejores tasas de germinación, libre de contaminación bacteriana y/o fúngica.

Plantas germinadas a partir de semillas esterilizadas según estos procedimientos fueron utilizadas en experimentos de regeneración (Montero et al, en preparación), siendo seccionadas en cinco tipos de explantes (plúmula, epicótilos, nodos cotiledonares, hipocótilos y radículas) y sembradas en medio de MS con hormonas. Al cabo de dos semanas la plantas provenientes del tratamiento C presentaron una contaminación bacteriana de un 97.6% lo que indicó que este tratamiento mantenía un alto grado de contaminación endofítica latente, que se desarrollaba sobre el tejido con el paso del tiempo y cuando las condiciones de cultivo eran idóneas.

Por ello, se probaron nuevamente los tres tratamientos de asepsia descritos en el experimento 1, haciéndose cambios para homogenizar sus resultados, de la siguiente forma: a) En el caso del tratamiento "B", el tiempo de inmersión en

Benlate al 5% se redujo de 6 horas a 30 minutos. Igualmente, en este caso se aumentó el lapso de incubación en solución de clorox, pasando de 1 a 15 minutos; b) En todos los casos, se introdujo un baño en agua corriente posterior al tratamiento de exposición al agente primario de desinfección; y c) En el tratamiento "C", se incluyó la inmersión final en ácido cítrico empleada en los toros dos tratamientos comparados.

Las semillas sometidas a estos tratamientos se sembraron en algodón humedecido con agrimicin 0.3% + benlate 0.3% ( A+B); benlate 0.15% (B) y agua estéril. Se sembraron 9 frascos por tratamiento; 3 frascos por cada medio y 4 semillas por frasco. Yn cuarto tratamiento, denominado tratamiento "D", corresponde a un control experimental en donde las semillas fueron lavadas con agua estéril y sembradas en los diferentes medios, para contrastar el efecto de la asepsia y el medio de germinación. Los resultados de las tres replicas de esta experiencia final se observan en la tabla 5, a saber:

**Tabla 5**

Tratamiento	A			B			C			D		
	A+B	B	Agu a	A+B	B	Agu a	A+B	B	Agu a	A+B	B	Agu a
# de semillas germinad as asépticas	7 3 11	8 4 5	2 3 4	4 2 2	5 1 4	4 1 3	2 2 0	1 0 2	2 1 2	1 3 1	3 1 3	0 0 0
%germinación	58.3	47.2	25	22.2	27.7	22.2	11.1	8.3	13.8	41.6	58. 3	0
%contaminación	0	8.3	16.6	0	8.3	8.3	0	5.3	23.8	100	10 0	100

Mediante un análisis de varianza bifactorial para un experimento completamente aleatorizado, se concluyó que existe una diferencia significativa entre los tratamiento de asepsia utilizados. Este no es el caso para la comparación entre tratamientos secundarios de germinación. Por otro lado, los resultados no arrojan diferencias significativas a la hora de comparar la interacción de los dos niveles de tratamiento aséptico.

### Conclusión

Según lo observado en este trabajo, el tratamiento "A" muestra resultados que superan a los otros dos, en cuanto a una buena correlación entre viabilidad de semillas (medidas como semillas germinadas) y asepsia alcanzada (medida como ausencia observable de crecimiento patógeno sobre los explantes).

Experiencias en donde se analizó la introducción de un agente secundario para controlar el crecimiento ulterior de endofitos persistentes, presentes en las plántulas recién germinadas, parecen indicar que para tales efectos es

suficiente la incubación en presencia de Benlate, a las concentraciones reportadas.

Por otro lado, los resultados del análisis estadístico derivado de las últimas experiencias, parecen indicar que no existe correlación real entre uno u otro nivel de desinfección sobre los dos tipos de resultados medidos (viabilidad y asepsia). Esta aparente contradicción pudiera derivarse de error intrínseco en la muestra analizada, la cual probablemente deba ser ampliada en ulteriores experiencias.

#### Bibliografía.

- 1) "Plant Regeneration in pidgeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp) by organogenesis, por Mohan, M.L.y Krishnamurty, K.V. (1998), en *Plant Cell Reports*, 17 (9): 705-710.
- 2) "Thidiazouron-induced shoot regeneration in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.)", por Eapen, S., Tivarekar, S. and George, L. (1998), en *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53 (3) 217-220.
- 3) "Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of pigeonpea (*Cajanus cajan*)", por Abnazahgan, V.R. y Ganapathi, A. (1999). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 179-184.