

J.A. Marín, M. Boudabous, P. Lorente, E. García, P. Andreu y A. Arbeloa

**SANEAMIENTO IN VITRO DE "DOUCE DE DJERBA",
UNA VARIEDAD DE MANZANO MICROPROPAGADA**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **106** N.º 4 (303-307), 2010

Nota técnica

Saneamiento in vitro de "Douce de Djerba", una variedad de manzano micropropagada

J.A. Marín*, M. Boudabous**, P. Lorente*, E. García*, P. Andreu*
y A. Arbeloa*

* Estación Experimental de Aula Dei-CSIC, Av. Montañana 1005, 50059 Zaragoza, España.
E-mail: jmarin@eead.csic.es

** Institut des Régions Arides (IRA), Medenine, Route El Jorf 4119, Tunisie.

Resumen

Se describe la aplicación de un método sencillo y eficaz para controlar una contaminación endógena bacteriana en cultivos in vitro de brotes de manzano, que mostraron crecimiento de bacterias de origen endógeno, mediante el subcultivo sucesivo de los ápices en medio de cultivo con cefotaxima. Las bacterias endógenas son frecuentes en cultivos in vitro iniciados a partir de explantos tomados de árboles adultos crecidos en campo y afectan tanto al crecimiento de brotes como a la organogénesis de brotes y raíces adventicias. Utilizamos brotes de manzano del cv. "Douce de Djerba" cultivados in vitro que mostraban crecimiento bacteriano en la base de los brotes. Mientras que tratamientos de 1 h con soluciones de hipoclorito de sodio al 0.1% o al 1.0% dañaron los brotes y fueron ineficaces, la adición de cefotaxima estéril al medio autoclavado (MS modificado) a 150 mg l⁻¹ inhibió el crecimiento bacteriano y mejoró tanto el crecimiento de los brotes como la expansión de las hojas. Tras el tercer subcultivo en medio con cefotaxima, no se detectó ningún crecimiento bacteriano en el medio, tanto en el medio de cultivo como en placas PYGA. La longitud de los brotes tratados con cefotaxima fue el doble que la de los brotes sin tratar (32.7 ± 2.71 mm vs. 15.95 ± 1.48 mm respectivamente). El método descrito aquí permitirá el control de bacterias endógenas sensibles a la cefotaxima in vitro, eliminando una fuente de variabilidad incontrolada que puede afectar diferentes estudios.

Palabras clave: cefotaxima, *Malus x domestica*, PYGA, bacterias endógenas.

Abstract

Elimination of bacteria from in vitro shoot cultures of "Douce de Djerba", a micropropagated apple cultivar

We describe here the application of a simple and efficient method to control an endogenous bacterial contamination of in vitro shoot cultures of apple through successive subcultures of shoot apices on media with cefotaxime. Endogenous bacteria are frequent in cultures derived from explants taken from adult trees grown in the field and affect both shoot growth and organogenesis as in the adventitious regeneration of shoots and roots. We used apple shoots cv. "Douce de Djerba" cultured in vitro that showed bacterial growth at the base of the shoots. While 1 h treatments with 0.1% or 1.0% sodium hypochlorite were harmful and ineffective, the addition of sterile cefotaxime to autoclaved culture medium (a modified MS medium) at 150 mg l⁻¹ improved both shoot length and leaf expansion inhibiting bacterial growth. After the third subculture on medium with cefotaxime no visible bacterial growth was detected and shoots grown on MS without cefotaxime did not show any bacterial growth both in the culture medium and in PYGA plates. Length of cefotaxime-treated shoots was twofold that of untreated shoots (32.7 ± 2.71 mm vs. 15.95 ± 1.48 mm respectively). The method described here would allow the control of endogenous bacteria that are sensitive to cefotaxime in in vitro cultures, removing a source of uncontrolled variability that could affect different studies.

Key words: cefotaxime, *Malus x domestica*, PYGA, endogenous bacteria.

La aparición de contaminaciones endógenas es frecuente en cultivos *in vitro* iniciados a partir de explantos tomados de árboles adultos crecidos en campo y propagados vegetativamente. A veces, el crecimiento bacteriano se inhibe en cultivo durante largo tiempo (incluso años), pero una situación de estrés puede provocar su aparición en el medio de cultivo junto a la base de los brotes. El crecimiento bacteriano puede ser inhibido durante el cultivo de brotes por la posible acción de la citoquinina en el medio de multiplicación, desarrollándose posteriormente durante el cultivo de brotes en un medio de enraizamiento, con altas concentraciones de auxina y sin citoquinina, aunque, a veces, aparece de forma irreversible sin conocerse la causa desencadenante, incluso en medio de multiplicación. Los efectos negativos de las contaminaciones endógenas causan disminución del crecimiento y reducción de la capacidad organogénica en la formación de nuevas raíces y brotes adventicios, pero también pueden tener un efecto beneficioso al impedir la hiperhidricidad (vitrificación) de los brotes. Dado que los efectos de las bacterias endógenas están fuera de control es imprescindible contar con métodos que favorezcan su eliminación, o al menos su control, y ese es el objetivo de este trabajo.

Se utilizaron brotes de manzano del cultivar "Douce de Djerba", originario de la isla de Djerba (Túnez), cultivados *in vitro* según se ha descrito anteriormente (Boudabous et al, 2010) y que mostraban crecimiento de bacterias en la base de los brotes. Se realizaron dos tipos de tratamientos de desinfección: 1) mediante la inmersión de los brotes de manzano en soluciones de hipoclorito sódico (0.1% y 1.0% de cloro activo) durante 1 hora y su paso posterior al medio de cultivo (De Fossard, 2007) y 2) mediante el cultivo en medio con el antibiótico cefotaxima (Cefotaxime sodium, Duchefa, Haar-

lem, Holanda) a 150 mg l^{-1} (Licea-Moreno et al., 2007), añadido estéril al medio de cultivo autoclavado. En todos los casos los brotes se cultivaron posteriormente en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado con tiamina ($1.19 \text{ } \mu\text{M}$), BAP ($5 \text{ } \mu\text{M}$), IBA ($0.5 \text{ } \mu\text{M}$) y sacarosa (30 g l^{-1}), ajustando el pH a 5.5 con KOH (1N) y solidificando el medio con Difco Bacto Agar (7 g l^{-1}), según se ha descrito anteriormente (Andreu y Marín, 2005). Tras 3 semanas de cultivo, los brotes tratados con las soluciones de hipoclorito sódico mostraban daños variables e incluso muerte de brotes, por lo que no se continuaron los tratamientos. Sin embargo, los brotes cultivados con cefotaxima mostraron un mayor crecimiento y la ausencia de síntomas de toxicidad. El tratamiento se repitió ocho veces más cultivando los ápices ($< 10 \text{ mm}$) en el mismo medio con cefotaxima cada 3 semanas. Tras el tercer subcultivo, no se encontraron signos visuales de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, y parte de los brotes fueron subcultivados en medio sin cefotaxima para controlar la posible desaparición del crecimiento bacteriano, repitiendo este procedimiento en los sucesivos subcultivos, de forma que se pudiera establecer el tiempo necesario de cultivo en presencia de antibiótico para la eliminación del crecimiento bacteriano. Al finalizar los 9 subcultivos en medio con cefotaxima, se realizaron siembras de las diferentes líneas de cultivo en placas con medio PYGA, un medio de detección de bacterias (Cornu y Michel, 1987) que contiene peptona, extracto de levadura, glucosa y Agar, colocando las bases de los brotes cultivados (1-2 mm) en el medio de detección y observando la evolución del cultivo tras 3 días a $27 \text{ } ^\circ\text{C}$ utilizando como control cultivos sin tratar. Igualmente eficaz fue la siembra realizada mediante el contacto de la base de los brotes con la superficie del medio PYGA.

Los tratamientos con hipoclorito sódico dañaron gran parte de los tejidos, aunque de forma sorprendente, el tratamiento con menor concentración (0.1%) causó más necrosis y muerte de brotes, sin eliminar el crecimiento bacteriano, que el más concentrado (1.0%) en el que algunos brotes mostraban un aspecto aceptable y sin síntomas aparentes de crecimiento bacteriano, aunque éste apareció posteriormente. Serían necesarios más estudios para confirmar el efecto de las soluciones de hipoclorito sódico en el control de la contaminación bacteriana.

Tras los primeros subcultivos con cefotaxima, los brotes mostraron un mejor crecimiento y desarrollo que los controles, pero también la aparición de brotes con hiperhidricidad (vitricificación), debido posiblemente a una descompensación del metabolismo de la planta que incluía la interacción con las bacterias

endógenas. Sin embargo, subcultivos posteriores permitieron reducir la incidencia de la hiperhidricidad hasta su desaparición.

La eliminación del crecimiento bacteriano por la cefotaxima se produjo tras 3 subcultivos, mientras que en nogal fueron necesarios entre 4 y 8 subcultivos, según el clon tratado (Licea-Moreno *et al.*, 2007), lo que puede deberse a un menor grado inicial de infección, o a estar infectadas con bacterias diferentes que muestren distinto grado de resistencia al antibiótico por lo que sería aconsejable la identificación de las bacterias que infectan los tejidos.

La supresión del crecimiento bacteriano parece ser permanente, ya que en ningún caso ha vuelto a aparecer crecimiento bacteriano, ni ha sido detectado con el medio PYGA (Figura 1), incluso tras 6 subcultivos en medio sin antibiótico o tras 10 semanas de cultivo en un mismo medio.

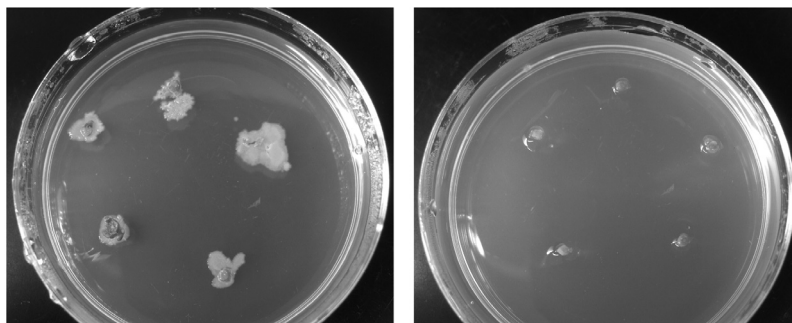


Figura 1. Crecimiento bacteriano desarrollado en la base de los brotes de manzano cv. "Douce de Djerba" cultivados en medio PYGA (izquierda) y ausencia de crecimiento bacteriano en las bases de brotes tras su cultivo en medio con cefotaxima (derecha).

Figure 1. Bacterial growth at the base of apple cv. "Douce de Djerba" shoots cultured on PYGA medium (left) and lack of bacterial growth at the shoot bases after their culture on medium with cefotaxime (right).

El medio de detección PYGA (Cornu y Michel, 1987) ha resultado adecuado para detectar la contaminación, ya que ha mostrado crecimiento bacteriano incluso en las huellas dejadas por los brotes al tocar la superficie del medio.

El tratamiento de los brotes con cefotaxima tuvo, además, un efecto inmediato en el aumento de su crecimiento y desarrollo. Los brotes saneados (sin crecimiento de bacterias en el medio de cultivo ni en el medio PYGA) crecieron en longitud el doble que

los brotes control (32.7 ± 2.71 mm vs. 15.95 ± 1.48 mm respectivamente) a la vez que mostraron un aspecto más sano y con hojas expandidas (Figura 2).

La cefotaxima es un antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias, sobretodo de las gram-negativo y que no es tóxica para células vegetales, por lo

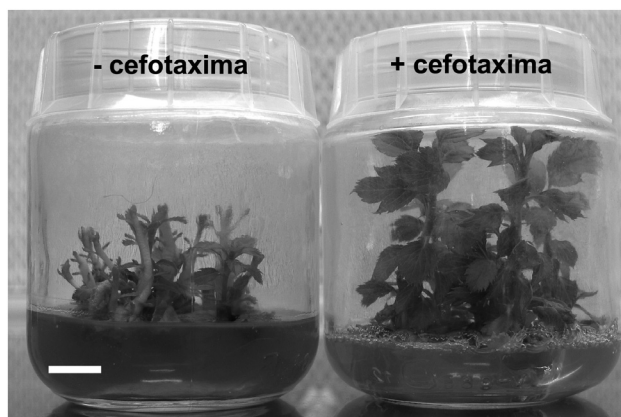


Figura 2. Cultivos control, sin cefotaxima, de manzano cv. "Douce de Djerba" in vitro (izquierda) y tras su crecimiento en medio con cefotaxima (150 mg l^{-1}) (derecha), a las tres semanas del subcultivo. Barra: 10 mm.

Figure 2. Apple cv. "Douce de Djerba" control cultures in vitro (left) and after growth on media with cefotaxime (150 mg l^{-1}) (right), 3 weeks after transfer. Bar: 10 mm.

que se usa habitualmente para controlar el crecimiento de *Agrobacterium* tras el co-cultivo con tejidos para la transformación genética de plantas. Aquí no ha mostrado signos de toxicidad a la dosis empleada que, sin embargo, ha sido eficaz para controlar y suprimir el crecimiento bacteriano. Su uso puede ser ampliado a diferentes cultivos y en nuestro laboratorio se está probando con éxito en diferentes especies de *Prunus*.

El método presentado aquí permitirá el control de las contaminaciones endógenas sensibles a la cefotaxima en cultivos in vitro, eliminando una variable fuera de control que afectaba de manera impredecible a los diferentes estudios en curso.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por la ayuda recibida del Gobierno de Aragón como Grupo de Excelencia A-43. M.B. disfrutó de una ayuda del Gobierno de Túnez.

Bibliografía

Andreu P, Marín JA, 2005. In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock "Adesoto 101" (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Sci. Hortic.* 106: 258-267.

- Boudabous M, Mars M, Marzougui N, Ferchichi A, 2010. Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica* 157: 513-524.
- Cornu D, Michel MF, 1987. Bacteria contaminants in shoot cultures of *Prunus avium* L. Choice and phytotoxicity of antibiotics. *Acta Hort.* 212: 83-86.
- De Fossard RA, 2007. Plant Tissue Culture Propagation. CD-ROM edition. Magpie Digital.
- Licea-Moreno RJ, Pérez C, González A, Cabrera E, 2007. Saneamiento de un banco de germoplasma de nogal híbrido. VII Reunión Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales, Alcalá de Henares 25-27 de Junio de 2007. Libro de resúmenes pp. 84-85.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- (Aceptado para publicación el 18 de noviembre de 2010)