

RECYT

Año 19 / N° 28 / 2017 / 16–20

Conservación *in vitro* de té a corto/mediano plazo en Argentina

In vitro conservation of tea at short/medium term in Argentina

Sandra P. Molina^{1,*}, Luis A. Mroginski², Hebe Y. Rey²

1- Equipo de Yerba Mate y Té, EEA Cerro Azul (CR Misiones) – INTA. Ruta Nacional 14, km 1085. Cerro Azul, Misiones.

2- Facultad de Ciencias Agrarias – IBONE (UNNE-CONICET). Sargento Cabral 2131. Corrientes.

* E-mail: molina.sandra@inta.gob.ar

Resumen

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar metodologías para la conservación *in vitro* a corto plazo de germoplasma de té. Se utilizó el clon CH 14 INTA perteneciente al programa de mejoramiento de la EEA Cerro Azul – INTA. Se evaluaron dos métodos de conservación a corto/mediano plazo (bajas temperaturas y medios mínimos). Las bajas temperaturas permitieron la conservación de segmentos nodales y yemas axilares hasta un período de 5 meses, con 73% y 67% de supervivencia, respectivamente. El uso de medios mínimos tuvo como resultado una respuesta similar, en términos de supervivencia, con valores de entre 60 y 90%, hasta los 120 días. Los resultados de este trabajo permiten concluir que es posible la conservación de germoplasma de té, a corto/mediano plazo.

Palabras clave: germoplasma, *Camellia sinensis*, bajas temperaturas, medios mínimos, explantes.

Abstract

This work was done to evaluate methodologies for germplasm *in vitro* preservation of tea. A Clone CH 14 INTA of breeding program of the EEA Cerro Azul – INTA was used. Two methods of short/medium term storage (low temperatures and suboptimal media) were evaluated. Low temperatures allowed the conservation of nodal segments and axillary buds -up to 5 months, with 73% and 67% survival, respectively. The use of suboptimal media had a similar response, with survival between 60 and 90% up to 120 days. In summary, it is possible to use short/medium term conservation with germplasm tea.

Keywords: germplasm, *Camellia sinensis*, low temperature, slow growth media, explants.

Introducción

La seguridad de las colecciones requiere su conservación por varias técnicas. Un gran número de especies producen semillas ortodoxas, las que pueden ser almacenadas en forma deshidratada en bancos de semillas a bajas temperaturas. Pero hay muchas especies que producen semillas recalcitrantes o intermedias las cuales son incapaces de sobrevivir a la deshidratación y son sensibles a las bajas temperaturas (1).

El método tradicional para la conservación de especies con semillas recalcitrantes y propagadas vegetativamente es a campo (2, 3, 4 y 5). Esto presenta varios problemas incluyendo la exposición a pérdida de material por factores bióticos (plagas, enfermedades) y abióticos (inclemencias climáticas), sumado a elevados costos de mantenimiento (6, 1, 7 y 3).

El cultivo *in vitro* resulta en una alternativa viable para la conservación genética de especies para las cuales el banco de semillas no es posible (8 y 7). El cultivo *in vitro* no sólo provee un método para la propagación clonal y el intercambio seguro de material vegetal sino que también

es usado para la conservación de germoplasma a mediano plazo (9, 10 y 11).

Sin embargo, el mantenimiento de grandes colecciones en sistemas de cultivo *in vitro* convencional requiere de subcultivos sucesivos a intervalos de tiempo regulares, exponiendo al material a riesgos de contaminación y variación somaclonal (12). Una manera de disminuir estos problemas es a través de la conservación a corto o mediano plazo, que logra espaciar los tiempos de los subcultivos.

El almacenamiento a baja temperatura de germoplasma producido *in vitro* es una alternativa para la preservación de una variedad de especies vegetales (13, 14, 15, 7 y 5).

En la mayoría de los casos, la baja temperatura en combinación con baja intensidad de luz o completa oscuridad, es usada para limitar el crecimiento (16, 17, 18 y 5). Las mayores ventajas de esta técnica son los requerimientos reducidos en labor y espacio, la eliminación de problemas relacionados a patógenos y la reducción de la erosión genética si las condiciones de almacenamiento son logradas (12).

También es posible limitar el crecimiento por alteración del medio de cultivo, principalmente por reducción del contenido de azúcar o concentración de los elementos

minerales, aplicación de ácido absícico y reducción del nivel de oxígeno (12, 9, 10, 19, 2 y 7).

La técnica de conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo ha sido desarrollada para varias especies: *Manihot esculenta* Cratz (20), *Castanea sativa* x *C. chestnut* y *Quercus* spp. (21), *Dioscorea* spp. (19), *Asparagus officinalis* (15) y *Fragaria vesca* L. (18). Hasta el momento, no existen antecedentes de conservación *in vitro* a corto/mediano plazo en té (*Camellia sinensis*). En el presente trabajo, las dos metodologías analizadas tienen como objetivo evaluar la aptitud del té para esta alternativa de conservación.

Material y Métodos

Se utilizaron como explantes segmentos nodales (con una longitud entre 0,5 y 1,0 cm), yemas axilares y meristemas caulinares (0,5 mm de longitud). Ellos fueron obtenidos de plantas madre del clon CH 14 INTA (Programa de Mejoramiento – EEA Cerro Azul – INTA) mantenidas en invernáculo, bajo un estricto control sanitario y nutricional.

La desinfección de los brotes se realizó por inmersión en etanol 70% durante 1 min seguida de una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 1,5% durante 20 minutos y 3 enjuagues sucesivos con abundante agua destilada estéril.

Los explantes desinfectados fueron cultivados en tubos de vidrio (25 mm x 120 mm; 40 ml de capacidad) conteniendo 10 ml de medio de cultivo solidificado con 0,7% de agar Sigma (A-1296).

Para la conservación a baja temperatura, el medio consistió en las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) (22), reducido a la mitad (½ MS) con 3% de sacarosa y 0,7% de agar Sigma (A-1296). La suplementación se realizó con 1,0 mgL⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP).

Para la conservación en medios mínimos, los segmentos nodales fueron cultivados en 4 medios de cultivo consistentes de ½ MS o ¼ MS, con 3% de sacarosa y 0,7% de agar Sigma (A-1296). Estos medios estuvieron desprovistos de reguladores de crecimiento o fueron suplementados con 0,01 mgL⁻¹ de BAP.

En todos los casos, el pH del medio fue ajustado a 5.8 con hidróxido de potasio (KOH) o ácido clorhídrico (HCl), antes del agregado del agar y luego esterilizado en autoclave a 121° C por 15 minutos.

El cultivo a baja temperatura se realizó en heladera (4° C), en oscuridad, durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días). Luego de cada tratamiento, los tubos fueron transferidos a un cuarto climatizado a 25 ± 2° C bajo un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad con una irradiación de 116 μmol.m⁻².s⁻¹ provista por lámparas fluorescentes frías. Finalmente, luego de 30 días en estas condiciones se registraron las siguientes variables: porcentaje de supervivencia, porcentaje de formación de vástagos y longitud de vástagos.

El cultivo en medios mínimos fue realizado en un

cuarto climatizado a 25 ± 2° C, en oscuridad durante 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días. Al cabo de cada período se registró el porcentaje de supervivencia, porcentaje de formación de vástagos y longitud de vástagos.

Los experimentos fueron conducidos con un diseño de bloques completos al azar. Cada tratamiento fue repetido 3 veces, con 10 réplicas por repetición y 1 explante/tubo. Las figuras muestran los resultados promedios con el error estándar (± SE). Los datos se analizaron mediante el análisis de la variancia (ANOVA) y las comparaciones de las medias fueron hechas usando el test de Tukey.

Resultados y Discusión

Conservación a baja temperatura

Existen referencias de la utilización de bajas temperaturas para la conservación *in vitro* en numerosas especies: *Solanum* spp. (13), cereza silvestre, castaño y roble (21), *Asparagus officinalis* (15), *Pyrus* sp. (23).

En el presente trabajo, con la conservación a baja temperatura (4° C) se obtuvieron los mejores resultados, en términos de sobrevivencia y formación de vástagos, cuando se utilizaron segmentos nodales y yemas axilares como explante. En cambio, con el uso de meristemas los valores de estos parámetros fueron significativamente más bajos. Los segmentos nodales de té lograron una elevada supervivencia (entre 97 y 73%) hasta los 5 meses de conservación a bajas temperaturas, momento a partir del cual disminuye drásticamente, llegando a valores aproximados al 10%. Un comportamiento similar se observó con el uso de yemas axilares como explante (Tabla 1).

Tabla 1: Supervivencia promedio (%) de segmentos nodales, meristemas y yemas axilares de té conservados a baja temperatura (4° C), durante diferentes períodos de tiempo. (Letras distintas en sentido de las columnas indican diferencias significativas para p<0,05).

Tratamiento	Segmentos nodales	Meristemas	Yemas axilares
Testigo (sin conservación a 4° C)	100,0 ^a	50,0 ^a	100,0 ^a
30 días a 4° C	93,3 ^a	6,7 ^b	93,3 ^a
60 días a 4° C	96,7 ^a	6,7 ^b	93,3 ^a
90 días a 4° C	90,0 ^a	0,0 ^b	73,3 ^a
120 días a 4° C	86,7 ^a	0,0 ^b	66,7 ^a
150 días a 4° C	73,3 ^a	0,0 ^b	66,7 ^a
180 días a 4° C	10,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b

Si bien no existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de sobrevivencia hasta los 150 días, se observa una disminución progresiva a medida que el período de almacenamiento aumenta. Resultados similares fueron encontrados por *Ahmed et al.* (2010) (23) en la conservación de germoplasma de *Pyrus*.

En el presente trabajo, un mayor tiempo de exposición provocó el amarronamiento y posterior muerte de los explantes. Según *Janeiro et al.* (1995) (21), la necrosis de los explantes es común cuando se realiza el almacenamiento

a baja temperatura, pero aparentemente los explantes necróticos podrían sobrevivir un ciclo de sub-cultivo en cámara de crecimiento bajo condiciones normales, donde algunos cultivos marrones pueden proliferar, especialmente desde yemas laterales que permanecen inmersas en el agar.

Janeiro *et al.* (1995) (21), trabajando con castaño, encontraron que el porcentaje de supervivencia disminuyó dramáticamente a 42 y 29% después de 6 y 12 meses de conservación a baja temperatura ($2 \pm 1^\circ \text{C}$).

Respecto a la variable formación de vástagos, se observó en general el mismo comportamiento con los tres explantes utilizados. Los valores más altos correspondieron al testigo y a períodos de conservación más cortos. A medida que aumentó el tiempo de conservación a baja temperatura, disminuyó la formación de vástagos (Tabla 2). Los segmentos nodales presentaron los mayores porcentajes de formación de vástagos, seguidos por las yemas axilares, siendo los meristemas los explantes con menor capacidad de regenerar, luego de la conservación a baja temperatura.

Tabla 2: Formación de vástagos promedio (%) de segmentos nodales, meristemas y yemas axilares de té conservados a baja temperatura (4°C), durante diferentes períodos de tiempo. (Letras distintas en sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Tratamiento	Segmentos nodales	Meristemas	Yemas axilares
Testigo (sin conservación a 4°C)	100,0 ^a	36,7 ^a	50,0 ^a
30 días a 4°C	73,3 ^{ab}	6,7 ^b	46,7 ^{ab}
60 días a 4°C	76,7 ^{ab}	6,7 ^b	40,0 ^{abc}
90 días a 4°C	76,7 ^{ab}	0,0 ^b	26,7 ^{abcd}
120 días a 4°C	70,0 ^b	0,0 ^b	13,3 ^{bcd}
150 días a 4°C	56,7 ^b	0,0 ^b	6,7 ^{cd}
180 días a 4°C	6,7 ^c	0,0 ^b	0,0 ^d

Para la variable longitud de vástagos, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los distintos tratamientos. Sólo se observó una mayor longitud de vástagos cuando se utilizaron segmentos nodales como explante (Tabla 3). En general, los vástagos no presentaron necrosis ni amarramiento (Fig. 1).

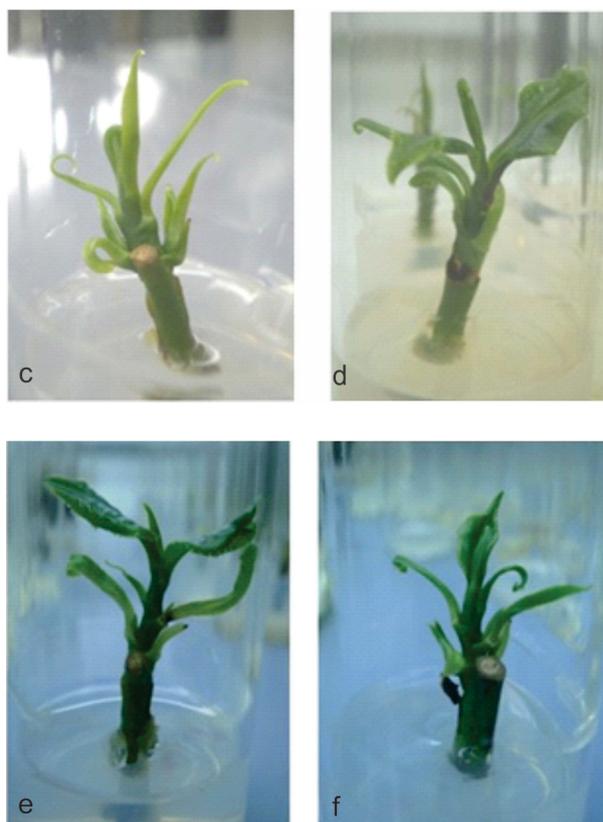
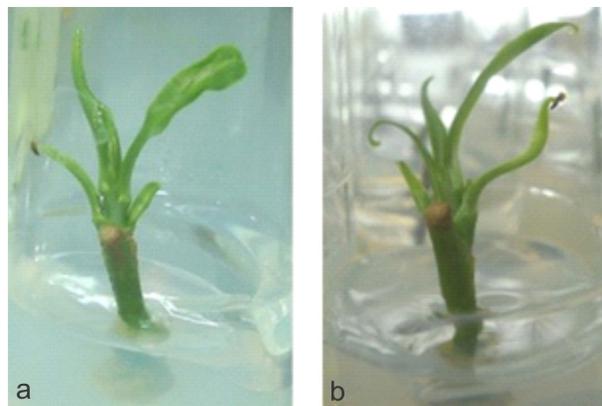


Figura 1: Vástagos formados en segmentos nodales de té, conservados a baja temperatura (4°C), durante diferentes períodos de tiempo: a) 30 días, b) 60 días, c) 90 días, d) 120 días, e) 150 días y f) 180 días. (Las barras verticales indican 1,0 cm).

Tabla 3: Longitud promedio de vástagos formados a partir de segmentos nodales, meristemas y yemas axilares de té, conservados a baja temperatura (4°C), durante diferentes períodos de tiempo. (Letras distintas en sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Tratamiento	Segmentos nodales	Meristemas	Yemas axilares
Testigo (sin conservación a 4°C)	1,17 ^a	0,50 ^a	0,70 ^a
30 días a 4°C	1,03 ^a	0,17 ^{ab}	0,53 ^{ab}
60 días a 4°C	1,03 ^a	0,17 ^{ab}	0,60 ^{ab}
90 días a 4°C	1,17 ^a	0,0 ^b	0,53 ^{ab}
120 días a 4°C	1,23 ^a	0,0 ^b	0,43 ^{ab}
150 días a 4°C	0,77 ^a	0,0 ^b	0,17 ^{ab}
180 días a 4°C	0,73 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b

Conservación en medios mínimos

El uso de bajas concentraciones de elementos minerales o de sacarosa en el medio de cultivo, es usado con éxito en el mantenimiento de colecciones *in vitro* de algunas especies, por ejemplo *Dioscorea* spp. (19) y *Lilium* sp. (24).

En el presente trabajo, el uso de medios mínimos para la conservación de segmentos nodales no tuvo la misma respuesta, en términos de supervivencia, que la baja temperatura. La modificación en la concentración de las sales del medio de cultivo y/o el regulador de crecimiento permitió una supervivencia relativamente alta (60-90%) hasta los 120 días. En general, hasta los 120 días no se registraron diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo. Estas diferencias se registraron recién cuando el período de

conservación se extendió a 150-180 días (Fig. 2).

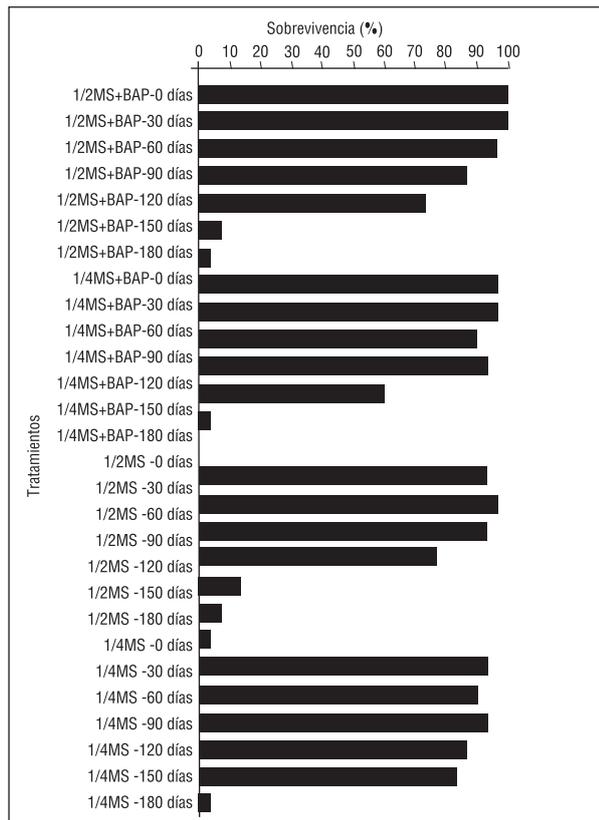


Figura 2: Supervivencia promedio (%) de segmentos nodales de té, conservados en medios mínimos, durante diferentes períodos de tiempo en oscuridad. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

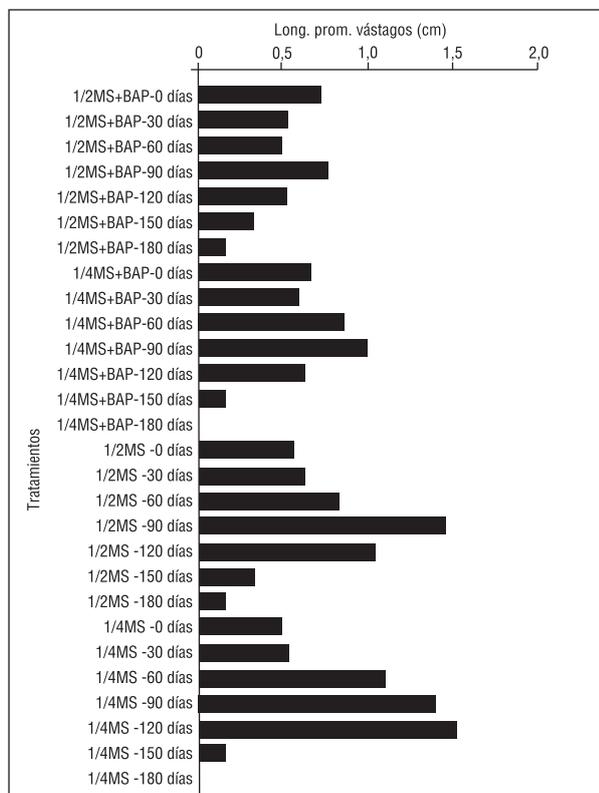


Figura 3: Longitud promedio de vástagos generados a partir de segmentos nodales de té, conservados en medios mínimos, durante diferentes períodos de tiempo en oscuridad. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

La oscuridad produjo la aparición de clorosis que se hizo más evidente a medida que aumentó la duración del período de conservación. Esta sintomatología fue observada principalmente en el medio constituido por $\frac{1}{2}$ MS sin BAP. Problemas de clorosis fueron también observados por Janeiro *et al.* (1995) (21) en la conservación de cereza silvestre a baja temperatura y por Corredoira *et al.* (2011) (25) en *Camellia* sp. y otras especies.

El mayor tiempo de exposición a la oscuridad provocó además el crecimiento de los vástagos (mayor longitud de entrenudos) generados a partir de los explantes. La mayor longitud de vástagos se registró en los medios de cultivo que carecían de BAP (Fig. 3).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo permiten concluir que es posible la conservación de germoplasma de té, a corto/mediano plazo.

La conservación de cultivares de té a corto plazo, mediante la reducción de temperatura, es posible hasta 150 días con porcentajes de supervivencia relativamente altos. Los segmentos nodales y yemas axilares fueron los explantes con mejores respuestas.

En el caso de la utilización de medios mínimos, se podría conservar germoplasma de té hasta 120 días, sin que la capacidad de regeneración se vea afectada.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), a través del Proyecto Específico “Manejo Integrado y Gestión Ambiental de Cultivos Industriales”, perteneciente al Programa Nacional de Cultivos Industriales.

Referencias

1. Engelmann, F.; Engels, J. 1999. *Efforts to sustain ex situ collections: technological aspects*. Implementation of GPA in Europe – Braunschweig Proceedings. Part I. Ex situ conservation. 88-95.
2. Engelmann, F. y Engels, J.M.M. 2002. *Technologies and strategies for ex situ conservation*. In: Managing Plant Genetic Diversity. Engels, J.M.M.; Ramanatha Rao, V.; Brown, A.H.D. y Jackson, M.T. (eds.). IPGRI. p.89-103.
3. Shibli, R.A.; Shatnawi, M.A.; Subaih, W.S.; Ajlouni, M.M. 2006. *In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review*. World Journal of Agricultural Sciences 2(4): 372-382.
4. Engelmann, F. 2011. *Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity*. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 47:5-16.
5. Kaviani, B. 2011. *Conservation of plant genetic resources*

- by cryopreservation. Australian Journal of Crop Science 5(6): 778-800.
6. Kuranuki, Y.; Sakai, A. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of tea (*Camellia sinensis*) by vitrification. CryoLetters 16: 345-352.
 7. González-Benito, M.E.; Clavero-Ramírez, I.; López-Aranda, J.M. 2004. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. Spanish Journal of Agricultural Research 2(3): 341-351.
 8. Lambardi, M.; De Carlo, A. 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits. (Jain, S.M.; Ishii, K. eds.). Kluwer Academic Publishers. pp.815-840.
 9. Ashmore, S.E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 67p.
 10. Withers, L.A. y Engelmann, F. 1998. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: Biotechnology in Agriculture. Altman, A. (ed.). Marcel Dekker Inc. Vol. 4. p.57-88.
 11. Rao, N.K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3(2):136-145.
 12. Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. Euphytica 57:227-243.
 13. Westcott, R.J. 1981. Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. Potato Res. 24: 331-342.
 14. Ballester, A.; Janeiro, L.V.; Vieitez, A.M. 1997. Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. Scientia Horticulturae 71: 67-78.
 15. Bekheet, S.A. 2000. *In vitro* preservation of *Asparagus officinalis*. Biologia Plantarum 43(2): 179-183.
 16. Reed, B.M. 1991. Application of gas-permeable bags for *in vitro* cold storage of strawberry germplasm. Plant Cell Reports 10: 431-434.
 17. Reed, B.M. 1992. Cold storage of strawberries *in vitro*: a comparison of three storage systems. Fruit Varieties Journal 46(2): 98-102.
 18. Hassan, N.A.; Bekheet, S.A. 2008. Mid-term storage and genetic stability of strawberry tissue cultures. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4(5): 505-511.
 19. Malaurie, B.; Trouslot, M.F.; Berthaud, J.; Bousalem, M.; Pinel, A.; Dubern, J. 1998. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea spp.*) germplasm. Electronic Journal of Biotechnology 1(3): 103-117.
 20. Roca, W.; Arias, D.I. y Chávez, R. 1991. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. y Mroginski, L.A. (eds.). CIAT Cap. 31, Cali. p.697-713.
 21. Janeiro, L.V.; Vieitez, A.M.; Ballester, A. 1995. Cold storage of *in vitro* cultures of wild cherry, chestnut and oak. Ann. Sci. For. 52: 287-293.
 22. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.
 23. Ahmed, M., Anjum, M.A.; Shah, A.H.; Hamid, A. 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. Pak. J. Bot. 42(3): 1639-1650.
 24. Bonnier, F.J.M.; Van Tuyl, J.M. 1997. Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 81-87.
 25. Corredoira, E.; San José, M.C.; Martínez, T.; Valladares, S.; Couselo, J.L.; Janeiro, L.; Vieitez, A.M.; Ballester, A. 2011. Conservación de germoplasma en especies leñosas con técnicas de cultivo *in vitro* y almacenamiento en frío. Spanish Journal of Rural Development 2:15-24.

Recibido: 04/08/2016.

Aprobado: 10/08/2017.