

Desarrollo de embriones somáticos de alcornoque en biorreactores de inmersión temporal

Jesús Jiménez, Inmaculada Hernández, Dolores López-Vela, Mariano Toribio y Jesús Alegre
 Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)
 Finca "El Encín". Apartado 127, 28800 Alcalá de Henares (Madrid).
 e-mail: jesus.jimenezga@madrid.org



INTRODUCCIÓN

El sistema de inmersión temporal (SIT) se basa en el empleo de medio líquido y el establecimiento de ciclos de aporte y retirada del medio. Esto permite aprovechar las ventajas del medio líquido (favorece la absorción de nutrientes, el crecimiento del material vegetal y la dilución de los metabolitos excretados), al tiempo que reduce sus inconvenientes (suprime el contacto continuo de los explantos con el medio de cultivo, evitando los problemas de asfixia y vitrificación). Por otra parte el SIT facilita el control y el estudio de la nutrición en el cultivo in vitro y puede contribuir al desarrollo óptimo de los explantos. En este trabajo presentamos la puesta a punto de un SIT aplicado a la obtención de embriones somáticos de alcornoque.

MATERIALES Y MÉTODOS

- MATERIAL VEGETAL:

Células somáticas desprendidas de zonas de necrosis de embriones somáticos en proliferación.

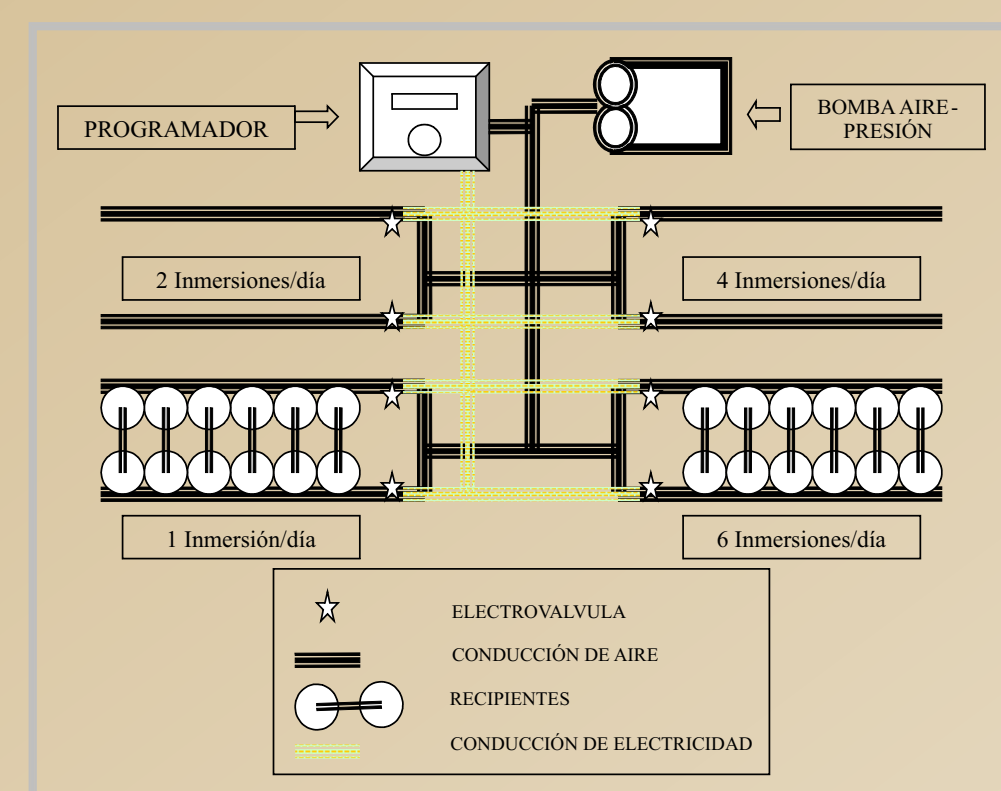


- EQUIPO Y DISPOSITIVO SIT:

El equipo utilizado consta de dos recipientes conectados entre sí con tubos de silicona que se acoplan a una bomba de presión. El sistema es gobernado por un programador, que abre y cierra una serie de electroválvulas para permitir el paso del medio en uno u otro sentido.



Vista del Sistema de Inmersión Temporal (SIT)



Esquema del SIT

- TRATAMIENTOS UTILIZADOS:

SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) SISTEMA ESTACIONARIO (ESTA)



1 Y 6 INMERSIONES /DÍA



INMERSIÓN PERMANENTE EN AGITADOR ORBITAL A (110 r.p.m.)

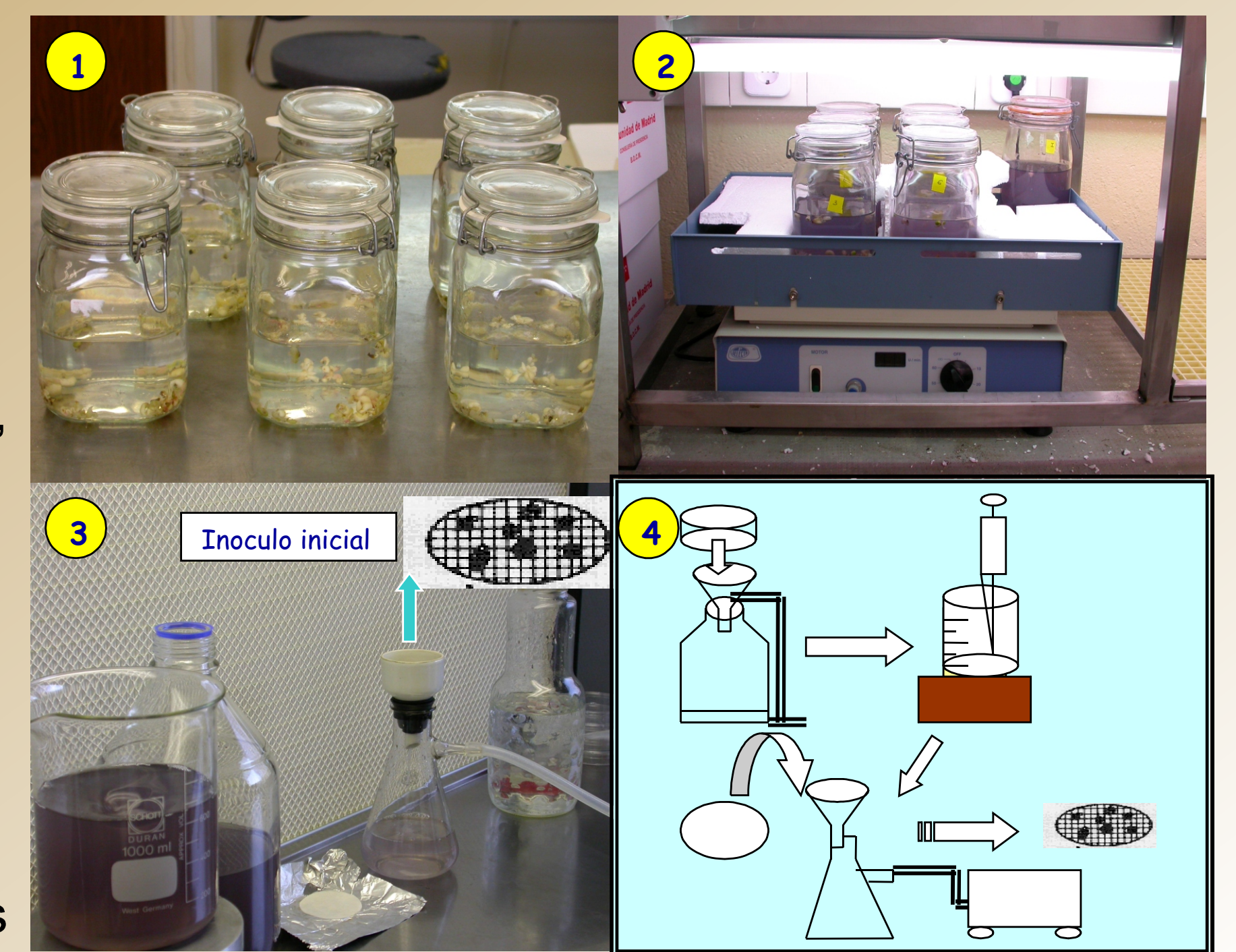
Medio de cultivo líquido MS (Murashige & Skoog, 1962) con macronutrientes SH (Schenk & Hildebrandt, 1972)

- PARÁMETROS ESTUDIADOS:

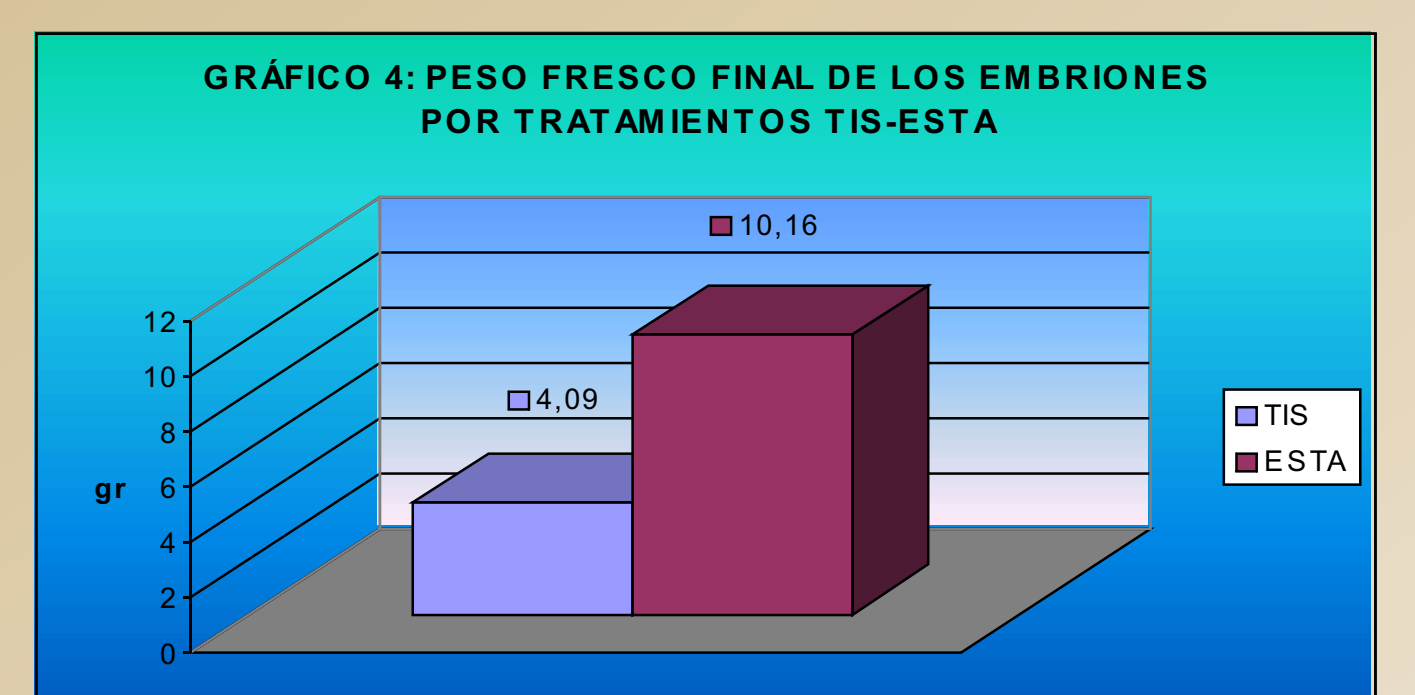
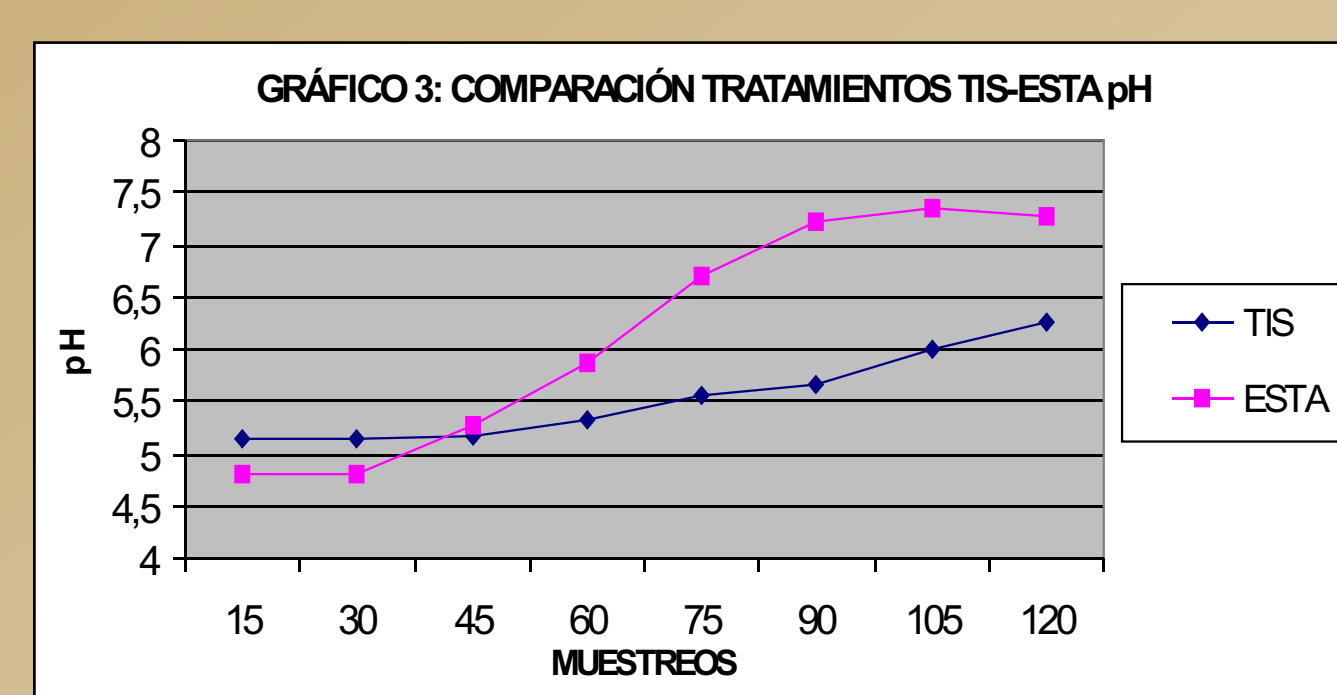
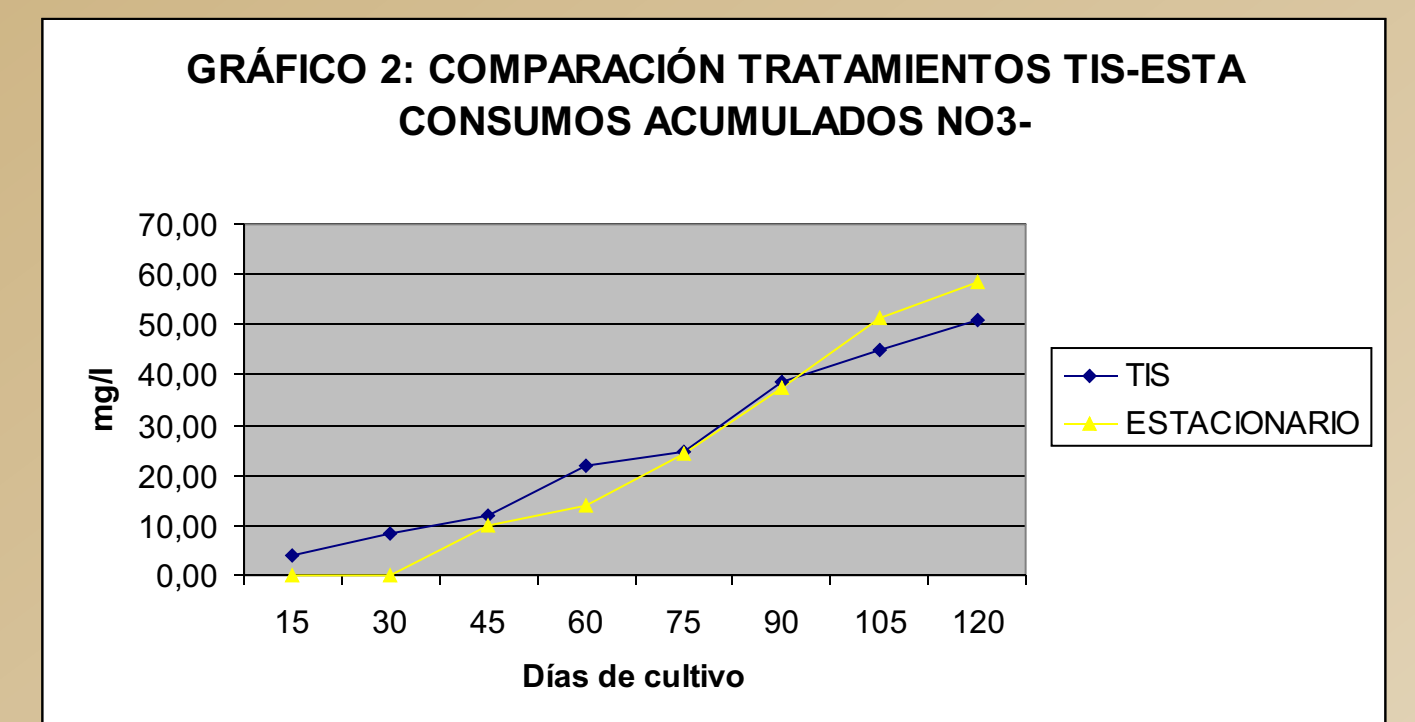
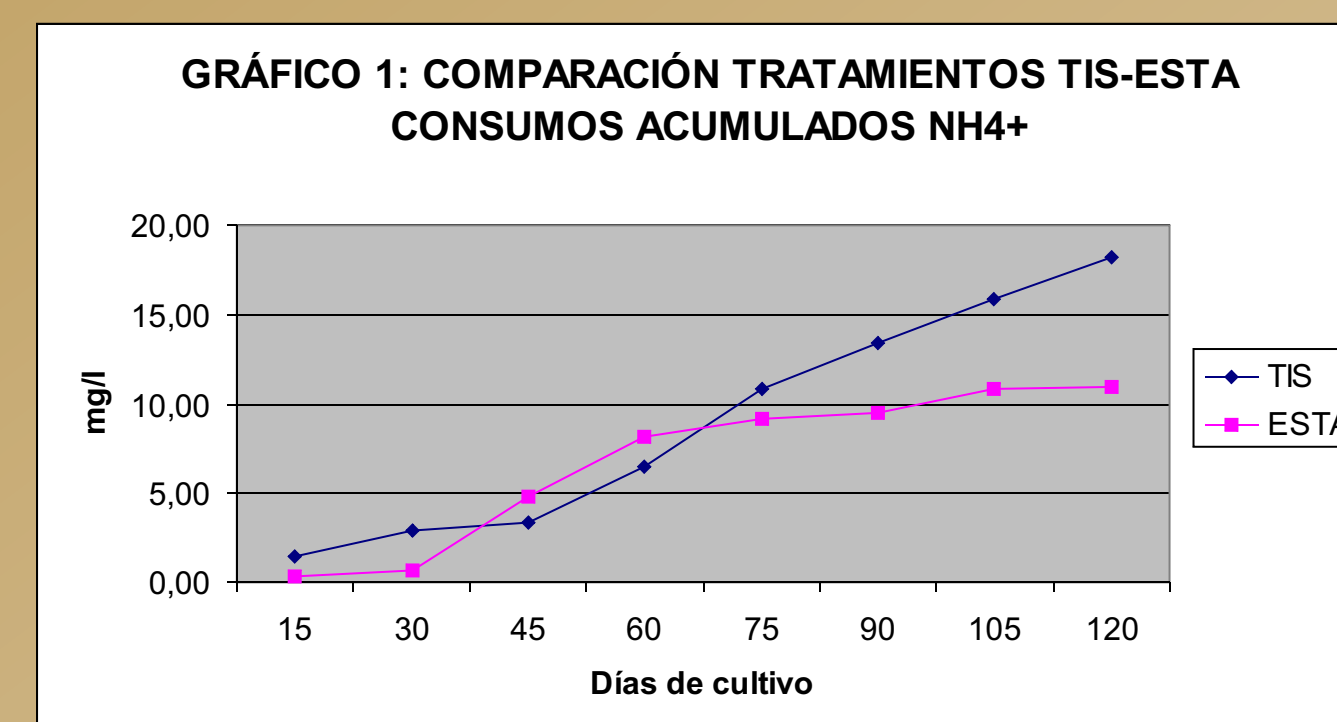
- NH₄⁺ → Espectrofotómetro - colorimetría
- NO₃⁻ → Ionómetro - Electrodo selectivo
- H₂PO₄⁻ → Espectrofotómetro - colorimetría
- Ntotal → Suma NH₄⁺, NO₃⁻
- pH → pH - metro
- CE → Conductímetro
- Evaporación → Pesadas
- Peso Fresco final de los embriones → Pesadas
- Desarrollo de los embriones → Se valoró el aspecto y tipos de estructuras (morfología)

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

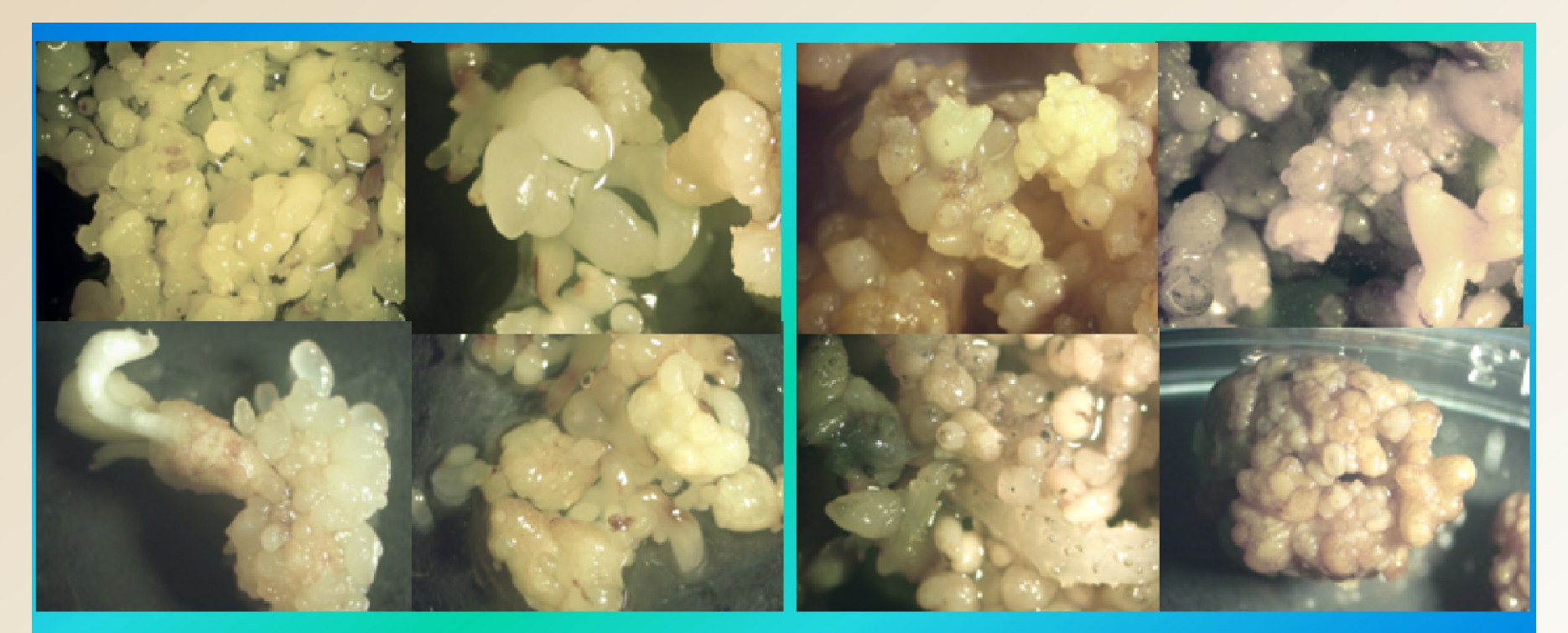
- Se seleccionaron masas de embriones somáticos de Q.s. en proliferación.
- Se cultivaron en 500 ml. de medio SH en agitador orbital (110 r.p.m.) en cámara de cultivo a 25 °C, durante 7 días.
- y 4. Se procede al filtrado del líquido con discos de papel estéril (0,2). Las células de necrosis desprendidas se retuvieron en el disco y éste fue introducido en los recipientes.



RESULTADOS



- El gráfico 1, señala diferencias entre los tratamientos SIT y ESTA, siendo éstas más acusadas en los últimos periodos de cultivo (a partir de 90 días). El consumo de amonio fue más elevado en el tratamiento SIT, lo que pudiera estar en relación con el hecho de que se formaran embriones más desarrollados, al contrario que en el ESTA que fueron en estado globular.
- En la gráfica 3, se observa una tendencia a elevarse en todos los tratamientos, pero es mucho más lineal y regular en el caso del SIT que en el ESTA que produce el necrosamiento de los embriones, coincidiendo además con una mayor captación de NO₃⁻ en las etapas finales del cultivo.
- En la comparación de los pesos frescos obtenidos (gráfica 4) podemos observar diferencias entre los tratamientos SIT-ESTA, siendo mucho mayores en el ESTA. Esto fue posiblemente debido a que la preparación del inóculo inicial del SIT no fue lo suficientemente homogénea.
- Las diferencias en el consumo de NO₃⁻ (gráfico 2) fueron más marcadas en la comparación de las frecuencias de SIT que en el de los tratamientos SIT-ESTA. El mayor consumo fue en el del tratamiento de 6 inmersiones.



SIT: Embriones más desarrollados, distintos estadios, desde globular hasta cotiledonar

ESTACIONARIO: Embriones aparentemente más sincronizados, pero en etapas globulares menos desarrolladas. Más necrosadas.