

Cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.)

In vitro culture of leaf segments
of sesame (*Sesamum indicum* L.)

Efraín Salazar^{1,2}
Carlos Romero³

Resumen

Se cultivaron *in vitro* segmentos de hojas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L. var. 'Inamar' y var. 'Arawaca'), provenientes de plantas creciendo en condiciones de campo o de umbráculo. Se evaluó el efecto de la concentración de hipoclorito de sodio (0, 1, 2, 4 y 8% p/v i.a.) y del tiempo de exposición a la solución desinfectante (0, 3, 5 y 10 min.), en la prevención de aparición de microorganismos contaminantes, encontrándose que los mayores porcentajes de supervivencia se obtuvieron con el uso de hipoclorito de sodio 1% p/v (i.a.) durante un máximo de 5 min., en los segmentos de hojas de ambas variedades. Al probar el efecto de 4 combinaciones de sales minerales (MS, NN, MPL y SN) en el desarrollo de los segmentos de hoja, se observó la mayor formación de callos al cultivarlos en medio con las sales MS. La proporción de segmentos de hojas provenientes de condiciones de campo, que presentaron formación de callos, fue menor que la observada en aquellos explantes provenientes de umbráculo; de igual modo, la formación de callos fue más tardía en los segmentos provenientes del campo. Los callos regenerados de estos explantes murieron 7-15 días después de su formación. Se probó el efecto de la luz en la respuesta morfológica observada, y se encontró que la presencia de luz fue indispensable para la producción de masas de callos 15 días después de la siembra. Zonas de coloración verdosa aparecieron sobre los callos creciendo en la luz, sin observarse la regeneración de ningún tipo de estructuras.

Palabras claves: Establecimiento *in vitro*, formación de callos, luz, sales minerales, esterilización superficial.

Recibido: 21-10-94 • Aceptado: 17-09-95

1 A quien debe dirigirse la correspondencia

2 Departamento de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Apartado 4653. Maracay 2101. Aragua, Venezuela

3 Instituto Universitario de Tecnología del Yaracuy. San Felipe. Estado Yaracuy, Venezuela

Abstract

Leaf segments from sesame plants (*Sesamum indicum* L. var 'Inamar' and var 'Arawaca') grown either under field or greenhouse conditions were cultured *in vitro*. The effects of sodium hypochlorite concentration (0, 1, 2, 4 and 8% w/v a.i.) and exposure to the desinfectant (0, 1, 3 and 5 min) on the prevention of microorganisms were tested. Higher percentage of survival was achieved with 1% w/v a.i. of the desinfectant for 5 min, in the leaf segments from both sesame varieties. The effect of 4 mineral salt combinations was also tested, and Segments showed a higher percentage of callus formation when cultured on MS mineral salts. Percentage of explants with callus formation was lower in segments coming from field conditions than those coming from the greenhouse. Callus formation was also delayed in the former explants. Calluses from field condition explants died 7-15 days after their formation. Light was indispensable for callus formation 15 days after culture. Green zones arose on the regenerated calluses, but no defined structures were observed.

Key words: In Vitro establishment, callus formation, light, mineral salts, surface sterilization.

Introducción

El ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) ha sido utilizado tradicionalmente como una fuente de aceite vegetal en Venezuela, presentando una de las composiciones de ácidos grasos más favorables para el consumo humano (9). Sin embargo, a pesar de la adaptabilidad geográfica del cultivo a las condiciones venezolanas, su producción ha disminuído en los últimos años, debido a la baja productividad y elevados costos de producción, producto de la acción de plagas y enfermedades, susceptibilidad a estrés hídrico y pérdidas de semillas al momento de la cosecha por la alta dehiscencia de las cápsulas. En este sentido, se hace prioritario implementar programas de mejoramiento genético y/o agronómicos a fin de aumentar los rendimientos de las explotaciones comerciales, y de esta

manera tomar ventaja del potencial económico que esta especie posee.

La Biotecnología se presenta como una herramienta muy útil, y una alternativa por demás efectiva, para inducir variabilidad genética, inducir mutaciones, obtener híbridos somáticos, así como para la generación de nuevos genotipos de ajonjolí a partir de células transformadas. Sin embargo, es prioritario establecer protocolos de regeneración *in vitro*, a fin de poder aplicar exitosamente cualquiera de las técnicas biotecnológicas mencionadas (5).

En el caso específico del ajonjolí, los trabajos a nivel de regeneración de plantas *in vitro* son muy escasos. George y col. (4) reportaron la obtención de explantes foliares de ajonjolí, al someter semillas a la acción de la bencil adenina. Datta y

Biswas (3) cultivaron botones florales de esta especie sometiénolos previamente a 10-50 KR de irradiación, causando anomalías en la meiosis de los granos de polen. Shi y Cai (12) obtuvieron la formación de callos a partir de polen de ajonjolí cultivado *in vitro*. Se ha obtenido, de igual manera, la formación de embriones somáticos a partir de segmentos de cotiledones (RAM, comunicación personal). Más recientemente, Artioli y Salazar (datos no publicados) obtuvieron la formación de plantitas completas de ajonjolí, mediante el cultivo de yemas apicales, encontrando determinante para la respuesta morfológica la combinación de auxinas y citocininas como suplementación exógena al medio de cultivo, y determinaron que la progenie generada *in vitro*, resultó morfológicamente idéntica a las plantas madres.

Sin embargo, la utilización de yemas apicales de ajonjolí presenta la dificultad de uso exclusivamente de la yema apical, dado el cambio muy rápido de las yemas axilares hacia yemas florales. En este senti-

do, el uso de explantes foliares se presenta como una posible vía para obtener gran número de plantas, a partir de un tejido, que no presenta limitaciones en cuanto a su disponibilidad. De igual manera, el establecimiento de protocolos de regeneración de plantas a partir de tejido foliar, permitirá la generación de variabilidad genética (variación somaclonal) (7) si se obtiene la formación de masas celulares (callos), como paso previo a la regeneración de las plantitas. De igual manera, el tejido foliar representaría un explante apropiado para experimentos de inducción de mutaciones, así como de transformación genética, de lograrse la regeneración de plantas por esta vía. Este tipo de tejidos ha sido exitosamente utilizado para la regeneración tanto de plantas herbáceas, específicamente solanáceas (6), como de plantas leñosas (1, 2, 13).

El presente trabajo tuvo como objetivo principal establecer las condiciones para el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de ajonjolí, como una vía alternativa para regenerar *in vitro* plantas de esta especie.

Materiales y métodos

Se trabajó con plantas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L. var. 'Inamar' y var 'Arawaca') provenientes de semillas pertenecientes a la colección de germoplasma de Ajonjolí del Centro Nacional De Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) en Maracay. Las plantas fueron cultivadas en las condiciones del campo experimental del CENIAP en Maracay, Venezuela, o en condiciones de umbrá-

culo, con riego automatizado por nebulización. El manejo agronómico de ambos tipos de plantas implicó el uso de fertilización completa (15-15-15) 2 g/planta una semana posterior a la germinación, e igual concentración de fertilizante fosforado (0-24-0), una semana posterior a la aparición de los primeros botones florales.

Las hojas se lavaron inicial-

mente con agua de chorro y jabón líquido comercial, para disminuir los restos de polvo, insectos y posibles residuos vegetales. Posteriormente se seccionaron en segmentos de aproximadamente 25 mm^2 de superficie sin incluir la nervadura central, sumergiéndolos en una solución de etanol 70% durante 1-2 min. Seguidamente se lavaron en una solución de hipoclorito de sodio (1, 2, 4 y 8% p/v i.a.) durante (3, 5 ó 10 min). En todos los casos, se incluyó un tratamiento control, al cual se le desinfectó con el fungicida y el alcohol 70% únicamente. Las pruebas del efecto de la concentración del desinfectante, se hicieron utilizando un tiempo único de exposición de 5 min, mientras que los ensayos sobre el efecto del tiempo de exposición a la solución desinfectante, se hicieron utilizando una concentración constante de 1%.

En condiciones de flujo laminar de aire esterilizado, se eliminó el exceso de desinfectante con tres lavados sucesivos en agua destilada esterilizada. Los segmentos se sembraron inmediatamente en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo 10

ml del medio de Murashige y Skoog (MS)(10), suplementadas con Tiamina, Piridoxina y Acido Nicotínico (1 mg/L respectivamente), 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mio-inositol, solidificado con 6 g/L de Agar Sigma y el pH ajustado a 5.8 ± 0.02 . Los tubos de ensayo se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 psi de presión, durante 20 min. Los explantes sembrados fueron colocados en la oscuridad o bajo luz fluorescente con irradianza de 16.95 W.m^{-2} y un fotoperíodo de 16 h, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Finalmente se probó el efecto de las sales minerales en el desarrollo *in vitro* de los segmentos de hojas, utilizándose la misma composición del medio (MS) descrito anteriormente, probándose además las sales minerales de Nitsch y Nitsch (NN) (11), del Medio para Plantas Leñosas (MPL) (8), y un medio sin sales minerales (SN). En todos los casos, la suplementación de vitaminas y compuestos orgánicos del medio de cultivo fue idéntica a la descrita en el párrafo anterior.

Resultados y discusiones:

Los experimentos realizados para controlar el desarrollo de microorganismos contaminantes, arrojaron los mismos resultados en las dos variedades utilizadas, y previnieron de igual forma la aparición de microorganismos patógenos tanto en el material proveniente del campo, como del proveniente de condiciones de umbráculo. En el cuadro 1 se resumen los resultados obtenidos al

variar la concentración de la solución desinfectante para desinfectar los segmentos de hojas de las variedades de ajonjolí 'Inamar' y 'Arawaca', los segmentos se expusieron a la solución durante 5 min. Como puede observarse, concentraciones mayores que 1% i.a. de hipoclorito de sodio fueron eficientes en prevenir la aparición de microorganismos patógenos en ambos tipos de explantes. Sin

Cuadro 1. Efecto de las concentraciones de la solución desinfectante durante 5 min. En el establecimiento in vitro de segmentos de hojas de ajonjolí var 'inamar' y var 'arawaca' cultivadas en condiciones de umbráculo.

	Concentración del desinfectante (% p.a.)										
	Control		1		2		4		8		
	I	A	I	A	I	A	I	A	I	A	
Segmentos sembrados	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Segmentos asepticos	00	00	25	25	25	25	25	25	25	25	25
% Supervivencia	00	00	100	100	00	00	00	00	00	00	00

I= Variedad 'Inamar'

A= Variedad 'Arawaca'

embargo, las concentraciones de 2, 4 y 8% i.a. presentaron efectos tóxicos sobre los explantes, los cuales se tornaron oscuros por la acción de la solución 2% p/v (i.a.), y totalmente blancos en las concentraciones mayores. Este efecto fue más drástico al hacer un ensayo adicional, en el que se aumentó el tiempo de exposición del tejido a la solución desinfectante hasta 10 min. Estos resultados pusieron de manifiesto el efecto tóxico del hipoclorito de sodio en concentraciones por encima de 2% p/v (i.a.)

Al observar los tratamientos no desinfectados con hipoclorito de sodio, se obtuvo una mayor contaminación, de naturaleza bacteriana, en los explantes provenientes del campo, que la observada en los explantes provenientes del umbráculo. Estos resultados evidencian la necesidad de aplicar el hipoclorito de sodio, y la mayor contaminación observada en los explantes de campo, puede explicarse por el poco control que puede ejercerse, en esas condiciones, sobre la incidencia de microorganismos en

los tejidos. El tratamiento con fungicidas previno completamente la aparición de hongos.

En el cuadro 2 puede observarse como tiempos de exposición al desinfectante (1% i.a.) iguales o mayores a 5 min., impidieron el desarrollo de microorganismos patógenos. Sin embargo, la exposición por 10 min al desinfectante ocasionó lesiones en los tejidos, a pesar de haberse usado la concentración más baja, de las estudiadas. Es posible, que los tejidos seleccionados sean muy jóvenes, y fisiológicamente no estén aptos para soportar tratamientos con cloro por más de 5 min. Al hacer pruebas con hojas completas, éstas se tornaron muy blandas o flexibles al contacto con la solución desinfectante, indicando la susceptibilidad del tejido al hipoclorito de sodio. Como regla general se evitó el uso de hojas que al ser colocadas inicialmente en agua, se tornasen blandas y/o flexibles, doblándose por completo, ya que no soportarían el tratamiento con la solución desinfectante.

Cuadro 2. Efecto del tiempo de exposición a la solución desinfectante (1% p.a.) En la esterilización superficial de segmentos de hojas de ajonjolí var 'inanaar' y var 'arawaca'

	Tiempo de exposición (min)							
	Control		3		5		10	
	I	A	I	A	I	A	I	A
Segmentos sembrados	25	25	25	25	25	25	25	25
Segmentos asépticos	00	00	07	05	25	25	25	25
%								
Supervivencia	00	00	28	20	100	100	100	100

La procedencia del explante (campo o umbráculo) tuvo influencia en el desarrollo *in vitro* de los segmentos de hojas. En aquellos provenientes de plantas de campo la formación de callos ocurrió mucho más lentamente y el porcentaje de explantes con inducción de callos fue menor que en los segmentos provenientes de condiciones de umbráculo. En el cuadro 3 puede observarse los resultados obtenidos en la respuesta inicial de los explantes al ser cultivados en el medio MS. La producción de masas celulares fue la respuesta inicialmente observada en todos los explantes sembrados que exhibieron algún tipo de cambio morfológico. Los segmentos provenientes de plantas en campo manifestaron la formación de masas celulares pequeñas, apreciables bajo lupa estereoscópica, 30 días después de la siembra, mientras que los segmentos provenientes de plantas creciendo en condiciones de umbráculo presentaron masas celulares apreciables a simple vista 15 días después de la siembra. De igual modo, las masas celulares producidas a partir de segmentos provenientes de condiciones de campo se necrosaron completamente entre 7-15 días posteriores a su formación *in vitro*; es decir entre 22 y 30 días posteriores al cultivo *in vitro* de los segmentos de hoja.

No se observó diferencias entre las variedades estudiadas, y la respuesta fue siempre la misma. Esta diferencia entre las plantas de campo y umbráculo puede ser debida al estado fisiológico inicial de ambos tipos de tejidos. El material prove-

niente de campo pudo estar sometido a limitaciones que afectaron su fisiología, y aún cuando morfológicamente no presentaron síntomas de estrés, las limitaciones fisiológicas y/o metabólicas retardarían el desarrollo *in vitro* de estos segmentos. En el caso del material creciendo en condiciones de umbráculo, las plantas están sometidas a un mejor manejo agronómico, con un mayor control en relación a la suplencia de nutrientes, agua e incidencia de plagas y enfermedades, lo cual las haría fisiológicamente más aptas para desarrollarse en condiciones *in vitro* más rápidamente.

En el cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos al cultivar los explantes bajo dos condiciones de iluminación. La presencia de luz resultó determinante y necesaria para el desarrollo *in vitro* de los explantes. El número de segmentos cultivados en la oscuridad que presentaron formación de callos, fue menor que aquellos cultivados bajo luz fluorescente, y el desarrollo de las células ocurrió más lentamente en las condiciones de oscuridad. Los callos desarrollados en condiciones de luz, presentaron a los 15 días después de la siembra, el doble del tamaño y un mayor grado de compactación que aquellos sembrados en la oscuridad. Estos callos, comenzaron a mostrar zonas de coloración verdosa 20 días después de la siembra, pero no se observó el desarrollo de ningún tipo de estructura de inida a partir de las masas celulares.

En el cuadro 5 se resume la respuesta exhibida por los segmen-

Cuadro 3. Efecto de la procedencia del explante en el desarrollo de segmentos de hojas de ajonjolí 30 días después de la siembra en condiciones *in vitro*.

	Inamar		Arawaca	
	Campo	Umbráculo	Campo	Umbráculo
Segmentos sembrados	50	50	50	50
Segmentos con callos	06	50	08	50
% Segmentos con callos	12	100	16	100

Cuadro 4. Efecto de la intensidad luminosa en el desarrollo *in vitro* de segmentos de hojas de ajonjolí 15 días después de la siembra *in vitro*.

	Inamar		Arawaca	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
Segmentos sembrados	50	50	50	50
Segmentos con callos	50	10	41	06
% Segmentos con callos	100	20	94	12

tos de hojas, provenientes de plantas cultivadas en condiciones de umbráculo, sembrados en medios con distintas combinaciones de sales minerales. Como puede observarse el mejor desarrollo se obtuvo en los explantes creciendo en el medio con las sales MS. Es de hacer notar, que los explantes creciendo en medio sin sales minerales no manifestaron ningún tipo de cambio morfológico, pero mantuvieron siempre su coloración verdosa.

El oscurecimiento de los tejidos fue la causa principal de pérdida de los explantes. Los segmentos sembrados en el medio NN o MPL no mostraron ningún tipo de desarrollo, oscureciéndose gradualmente desde las puntas del segmento hacia el centro del mismo.

El oscurecimiento fue un proceso lento, de aproximadamente dos semanas. La lentitud del proceso pudo ser debido a la acción de antioxidantes naturales presentes en los

Cuadro 5. Efecto de las sales minerales del medio de cultivo en el desarrollo *in vitro* de segmentos de hojas de ajonjolí (provenientes de plantas cultivadas en umbráculo) sembrados *in vitro*.

Sales% Minerales	Inamar			Arawaca		
	Seg. Sembrados	Seg. con callo	%	Seg. Sembrados	Seg. con callo	
MS	50	50	100	50	47	94
NN	50	00	00	50	00	00
MPL	50	00	00	50	02	04
SN	50	00	00	50	00	00

tejidos de ajonjolí, más específicamente del sesamol, el cual puede frenar la acción de las polifenoloxidasas. Sin embargo, la situación de estrés del tejido pudiese impulsar la síntesis de compuestos fenólicos como mecanismo de defensa, a tal grado que el contenido interno de antioxidantes no puede frenar por completo el proceso oxidativo de dichos compuestos. La disminución o eliminación de las sales minerales en el medio SN disminuiría la tasa metabólica del tejido, en tal grado, que la acción oxidativa no puede llevarse a cabo, con la consecuente coloración verdosa de los tejidos. Sin

embargo, la misma falta de nutrientes sería la responsable de no originar ningún tipo de cambio morfológico en los segmentos de hoja.

El medio compuesto por las sales MS propició los mayores porcentajes de formación de callos. Al comparar las formulaciones de las combinaciones minerales estudiadas, se destaca que las sales MS forman una solución rica en nutrientes, lo que hace suponer un requerimiento elevado de nutrientes por parte de los segmentos de hojas de ajonjolí para establecerse y posteriormente desarrollarse *in vitro*.

Conclusiones

Para inducir el desarrollo de segmentos de hojas de ajonjolí, éstos deben desinfectarse con una solución de hipoclorito de sodio al 1% p/v (i.a.) durante 5 min. Los segmentos de hojas deben provenir de plantas creciendo en condiciones de umbráculo,

y deben sembrarse en medio de cultivo conteniendo las sales minerales MS. Los explantes deben sembrarse bajo luz fluorescente con una intensidad aproximada de 16.95 Wm^{-2} y un fotoperíodo de 16 hrs, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Ing. Delis Pérez del Departamento de Recursos Fito-genéticos del CENIAP, por su valiosa colaboración proporcionando las se-

millas de ajonjolí y permitiendo la toma de muestras de sus parcelas en el campo experimental del CENIAP en Maracay.

Literatura citada

1. Bolyard, M.G.; Srinivasan, C.; Cheng, J. y Sticklen, M. 1991. Shoot regeneration from leaf explants of american elm and chinese elm. *HortScience* 26 (12):1554-1555.
2. Brand, M. H y Lineberger, R. D. 1988. In vitro adventitious shoot formation on mature-phase leaves and petioles of *Liquidambar styraciflua* L. *Plant Science* 57:173-179.
3. Datta, A. K. y Biswas, A. K. 1987. Gamma ray induced meiotic anomalies and pollen sterility in sesame. *Chrom. Inf. Serv.* 42:26-28
4. George, L.; Bapat, V.A. y Rao, P. S. 1987. In vitro multiplication of sesame (*Sesamum indicum*) through tissue culture. *Annals of Botany* 60 (1):17-21.
5. Halperin, W. 1986. Attainment and retention of morphogenetic capacity in vitro. In *Cell Culture and Somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. I. Vasil Ed. pp 3-47. Orlando, USA.
6. Kut, S.A y Evans, D.A. 1982. Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In Vitro* 18:593-598.
7. Larkin, P.J. y Scowcroft, W. R. 1981. Soma-clonal Variation-A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197-214.
8. Lloyd, G. y Mc Cown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Inter. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
9. Mazzani, B. 1967. Mejoramiento del ajonjolí en Venezuela. MAC-CEIAM. Centro de Investigaciones Agronómicas. Maracay. 125 pp.
10. Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassay for tobacco tissue. *Phys. Plant.* 13: 473-494.
11. Nitsch, J. y Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.
12. Shi-Shuwen y Cai-Ming. 1989. Effect of inducing factors on pollen callus formation of in vitro cultured anthers of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Oil Crops of China* (Mar 1989) :45-49.
13. Welander, M. 1988. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. *J. Plant Physiol.* 132:738-744.