

Empleo de ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*

Angel Espinosa Reyes*, Leonardo Salas Hernández, Orlando González Paneque y Juan J. Silva Pupo * Autor para correspondencia.

Universidad de Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Apdo. 21 C.P: 85100. Bayamo. Granma. Cuba. e-mail: angel@udg.co.cu

RESUMEN

Segmentos nodales de plantas *in vitro* de boniato del clon Jewel, se cultivaron en los medios de cultivo que a continuación relacionamos: **a)** sales de Murashige y Skoog (1962) suplementadas con ácido abscísico (0.0, 1.0, 5.0 y 10.0 mg.l⁻¹), **b)** sales de Murashige y Skoog (1962) suplementadas con manitol (0.0, 10.0, 15.0 y 20.0 g.l⁻¹) y **c)** sales de Murashige y Skoog (1962) a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%). La supervivencia durante la conservación fue alta en todos tratamientos empleados. El empleo del ácido abscísico (5.0 y 10.0 mg.l⁻¹) inhibió el crecimiento de las plantas. Se logró la disminución del crecimiento al emplear manitol en el medio de cultivo. La reducción de las sales de Murashige y Skoog al 25% y 50% de su concentración produjo un menor crecimiento de las plantas que el resto de las concentraciones evaluadas. Se obtuvo un alto porcentaje de recuperación del material conservado cuando se cultivaron en medio de cultivo fresco.

Palabras clave: biodiversidad, boniato, crecimiento mínimo, recursos fitogenéticos

ABSTRACT

Nodal segment from *in vitro* plants of Jewel clone sweet potato were culture in the following culture medias: **a)** Murashige and Skoog (1962) salts supplemented with abscisic acid (0.0, 1.0, 5.0 y 10.0 mg.l⁻¹), **b)** Murashige and Skoog (1962) salts supplemented with mannitol (0.0, 10.0 15.0 y 20.0 g.l⁻¹) and **c)** different Murashige and Skoog (1962) salts concentration (100, 75, 50 and 25%) were used. Survival during conservation was high in all experiment. The 5.0 and 10.0 mg.l⁻¹ abscisic acid strongly inhibited the plants growth. It was reached a decrease of growth when using mannitol in the culture medium. The media with 25% and 50% MS salts concentration caused a low of plants growth. When cultured in fresh culture medium it was achieved a high recovery ratio of conserved material.

Key words: sweet potato, minimal growth, phyto resources, biodiversity

INTRODUCCIÓN

El boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) adquiere cada día mayor importancia como producto alimenticio por su alto potencial de rendimiento, rusticidad y ciclo de producción corto; además, las posibilidades que ofrece para su industrialización y para la alimentación humana y pecuaria son excelentes (Peralta, 1992). Es un cultivo potencial para el futuro y uno de los más promisorios, rico en vitaminas y minerales (Wambugu, 1995). En Cuba, se cultiva desde la época precolombina y en la actualidad constituye una de las viandas más importantes en la alimentación de la población con una producción anual de 160 000 toneladas aproximadamente (Anónimo, 1998).

El desarrollo actual de la agricultura ha traído consigo la utilización en la producción de nuevos cultivares comerciales de altos potenciales de rendimiento, los cuales han ido desplazando a los tradicionalmente utilizados y estos cambios han provocado un incremento de la erosión genética en las especies vegetales cultivadas (Sánchez *et al.*, 1995). El boniato no ha escapado a esto, lamentándose actualmente la pérdida irreversible de un gran número de clones, fundamentalmente aquellos que han sido cultivados por los agricultores a través de los años, que se caracterizan por menores rendimientos, pero una mayor estabilidad

y resistencia a plagas y enfermedades que los actuales de mayor rendimiento.

En nuestro país desde hace varios años se conservan las variedades de boniato en bancos de semillas en el campo; sin embargo, esta es una tarea muy laboriosa y costosa, sumado a esto, el material vegetal está expuesto a pérdidas por catástrofes naturales y por el ataque de plagas y enfermedades. La aparición y desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos han ofrecido una alternativa ventajosa para la conservación *in vitro* de los recursos fitogenéticos, donde el material vegetal se conserva libre de plagas y enfermedades y ocupando poco espacio. Roca *et al.* (1993) plantearon que la conservación *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente del cultivo para desacelerar o suprimir totalmente el crecimiento de las células y tejidos; el objetivo es aumentar al máximo el período de transferencia del cultivo o extenderlo infinitamente. La conservación *in vitro* del boniato ha sido aplicada con éxito por otros autores (Jarret y Gawel, 1991; Lepoivre *et al.*, 1996) empleando diferentes sustancias que retardan el crecimiento *in vitro* de las plantas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico y de manitol, así como la disminución de la concentración de las sales inorgánicas del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de boniato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas *in vitro* de boniato del clon Jewel, mantenidas en medio de cultivo sólido constituido por las sales de Murashige y Skoog (MS) 1962, complementadas con ácido giberélico (10.0 mg.l⁻¹), ácido indolacético (0.05 mg.l⁻¹), tiamina (1.0 mg.l⁻¹), mioinositol (100 mg.l⁻¹) y sacarosa (30.0 g.l⁻¹) se emplearon como material donante. Para todos los tratamientos se utilizaron como explantes segmentos nodales de aproximadamente 2.0 cm de longitud y el medio de cultivo base empleado fue el formado por las sales MS (1962), sacarosa (30.0 g.l⁻¹), tiamina (1.0 mg.l⁻¹) al que se añadió ácido abscísico (0.0, 1.0, 5.0 y 10.0 mg.l⁻¹) en un primer experimento y manitol (0.0, 10.0, 15.0 y 20.0 g.l⁻¹) en un segundo experimento. En el tercer experimento se emplearon las sales MS (1962) a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%).

Para todos los medios de cultivo el pH fue ajustado a 5.7 y se solidificaron con phytigel (2.5 g.l⁻¹). Los mismos se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 150 kPa y se distribuyeron a razón de 10.0 ml en tubos de ensayos de 2.0 cm de diámetro y 15.0 cm de largo. Los explantes se cultivaron a razón de uno por tubo de ensayo y se incubaron en condiciones de iluminación solar de 45-54 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, humedad relativa de 80-85% y 25±2°C de temperatura. Se emplearon 30 segmentos nodales tratamiento. Las variables: porcentaje de supervivencia, número de yemas y raíces y longitud de las plantas fueron evaluadas a los siete meses para los experimentos donde se empleó ácido abscísico y manitol y a los cuatro meses para las diferentes concentraciones de las sales MS (1962). Con el objetivo de evaluar la recuperación del material se tomaron cinco

explantes por tratamiento y se cultivaron en medio MS (1962) complementado con AG₃ (10.0 mg.l⁻¹), AIA (0.05 mg.l⁻¹), tiamina (1.0 mg.l⁻¹) y sacarosa (30.0 g.l⁻¹) y se incubaron en condiciones ambientales iguales a las descritas anteriormente.

Procesamiento de los datos y análisis estadístico

Para todos los ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los datos obtenidos fueron procesados empleando el paquete estadístico Statistica para Windows. En todos los experimentos se aplicó un análisis de varianza simple (ANOVA). en los casos que presentaron diferencias significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La supervivencia fue alta en todos los tratamientos (Tabla 1) observándose una tendencia a ser mayor a medida que aumentaba la concentración de ácido abscísico. En los tratamientos con 0.0 y 1.0 mg.l⁻¹ de ABA, las plantas *in vitro*, aunque se mantenían vivas, habían perdido todas o la mayoría de las hojas y mostraban la formación de un gran número de raíces adventicias en los nudos más cercanos al medio de cultivo, estos síntomas pueden estar dados por el agotamiento progresivo de los nutrientes a medida que transcurre el tiempo de conservación. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Jarret y Gawel (1991), quienes obtuvieron altos valores de supervivencia, al conservar segmentos nodales de boniato del clon Jewel durante un año empleando ácido abscísico. También Westcott (1981) obtuvo valores de supervivencia superiores al 60%, al conservar durante 12 meses plantas *in vitro* de papa en medio de cultivo con 5.0 mg.l⁻¹ de ABA.

Tabla 1. Comportamiento de plantas *in vitro* de boniato conservadas durante siete meses empleando ácido abscísico.

ABA (mg.l ⁻¹)	Supervivencia (%)	Número de raíces	Número de yemas	Longitud del tallo (cm)	Recuperación (%)
0.0	80.00	41.80 a	12.80 a	14.80 a	100.00
1.0	85.00	40.66 a	12.83 a	10.66 b	100.00
5.0	85.00	2.60 b	1.60 c	0.60 c	100.00
10.0	90.00	2.28 b	1.42 c	0.24 d	95.00
C.V		2.95%	5.75%	6.76%	

Medias con letras iguales difieren para un valor de $p < 0.05$ C.V. Coeficiente de variación

La longitud del tallo y el número de yemas y raíces disminuyeron a medida que aumentó la concentración de ácido abscísico, siendo significativamente menores cuando se emplearon 5.0 y 10.0 mg.l⁻¹, concentraciones a las cuales donde prácticamente se inhibió por completo el crecimiento. Este efecto del ácido abscísico fue descrito por Vázquez y Torres (1991), quienes expusieron que el papel principal del mismo estaba basado en su efecto de inhibición del crecimiento y que además influía en otros procesos

fisiológicos como el de inducir el reposo o letargo de las yemas.

Estos resultados apoyan los descritos por Jarret y Gawel (1991), quienes obtuvieron una marcada disminución del crecimiento de ápices de boniato cuando adicionaron al medio de cultivo 10.0 mg.l⁻¹ de ABA, también Suksa *et al.* (1997) refirieron que el crecimiento de brotes de papaya fue marcadamente inhibido cuando fueron conservados durante 12

meses en medio de cultivo que contenía 5.0 y 10.0 μM de ABA.

La recuperación del material fue elevada en todos los tratamientos, obteniéndose a las seis semanas plantas *in vitro* con una apariencia similar a las no conservadas. Suksa *et al.* (1997) reportaron altos porcentajes de recuperación de brotes de papaya conservados en medio con 5.0 y 10.0 M de ABA sin aparecer plantas anormales.

Los resultados obtenidos en este experimento sugirieron que emplear ácido abscísico a concentraciones de 5.0 y 10.0 mg.l^{-1} puede resultar muy útil para la conservación *in vitro* de boniato durante un período igual e incluso superior a los siete meses, sin riesgos para la supervivencia y recuperación del material vegetal conservado.

Cuando se empleó manitol en el medio de cultivo se pudo observar que la supervivencia del material vegetal conservado disminuyó a medida que aumentó

la concentración del mismo (Tabla 2). A partir de los seis meses de conservación las plantas *in vitro* comenzaron a tornarse amarillas, con abundante caída de las hojas y la pérdida en algunos casos de la parte apical, seguida del oscurecimiento y posterior muerte de ellas, ocurriendo esto de forma más acentuada cuando se utilizó 20.0 g.l^{-1} de manitol, donde se observaron; además, plantas con crecimiento anormal, hiperhídricas y con más de un brote. Estos resultados indicaron un efecto fitotóxico del manitol sobre las plantas *in vitro* de boniato, lo cual puede atribuirse a que las altas concentraciones de esta sustancia disminuyen marcadamente el potencial hídrico del medio de cultivo, conllevando esto al desarrollo de células de la pared celular rígidas, gruesas y anormales en las plantas vitrificadas (Ziv *et al.*, 1987). Suksa *et al.* (1997), observaron al emplear manitol a la concentración de 60 g.l^{-1} en el medio de cultivo una disminución de la viabilidad y capacidad de recuperación de los brotes de papaya, así como el desarrollo de plantas anormales.

Tabla 2. Comportamiento de plantas de boniato conservadas *in vitro* durante siete meses empleando manitol.

Manitol (g.l^{-1})	Supervivencia (%)	Número de raíces	Número de yemas	Longitud del tallo (cm)	Recuperación (%)
0.0	80.00	41.80 a	12.80 a	14.80 a	100.00
10.0	45.00	35.12 a	11.12 a	6.75 b	90.00
15.0	40.00	34.71a	10.85 a	5.95 b	80.00
20.0	15.00	34.66 a	11.66 a	6.33 b	80.00
C.V		9.69%	13.16%	10.0%	

Medias con letras iguales difieren para un valor de $p < 0.05$ C.V. Coeficiente de variación

La longitud del brote disminuyó significativamente cuando se empleó manitol, pero se comportó de forma similar en las diferentes concentraciones evaluadas observándose plantas con entrenudos más cortos cuando se usó el regulador osmótico, pero con igual número de yemas. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Jarret y Gawell (1991a), quienes lograron disminuir el crecimiento de brotes apicales de boniato empleando 30.0 g.l^{-1} de manitol. Nodarse *et al.*

(1998), al conservar domos meristemáticos de caña de azúcar durante 12 meses empleando 30.0 g.l^{-1} de manitol, obtuvieron resultados satisfactorios en la supervivencia, sin cambios apreciables en el material conservado.

En la tabla 3 se aprecia el comportamiento de las plantas *in vitro* de boniato a los cuatro meses de conservadas en diferentes concentraciones de las sales MS (1962). La supervivencia del material vegetal fue elevada en todos los casos.

Tabla 3. Efecto de la disminución de las sales inorgánicas del medio de cultivo en la conservación de plantas *in vitro* de boniato durante cuatro meses.

Sales (%)	Supervivencia (%)	Número de raíces	Número de yemas	Longitud del tallo (cm)	Recuperación (%)
100.00	85.00	42.36 a	15.18 a	14.67 a	100.00
75.00	90.00	43.30 a	12.80 b	12.20 b	100.00
50.00	95.00	32.90 b	12.90 b	7.70 c	100.00
25.00	85.00	31.30 b	9.70 c	6.35 c	90.00
C.V		6.43%	10.04%	16.65%	

Medias con letras iguales difieren para un valor de $p < 0.05$ C.V. Coeficiente de variación

La longitud de las plantas fue menor a medida que se disminuyó la concentración de las sales de MS (1962) en el medio de cultivo, siendo significativamente menores en los tratamientos donde se utilizaron las sales al 25% y 50%, estos resultados sugieren que la disminución del contenido mineral en los medios de cultivo favorece el retardo del crecimiento debido a alteraciones que ocurren en el metabolismo celular. El número de yemas fue menor en el tratamiento con 25% de las sales, donde se observó el desarrollo de un gran número de raíces adventicias, acompañado con la caída de las hojas, lo cual pudo estar dado por el agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo. La recuperación del material vegetal fue alta en todos los tratamientos, obteniéndose plantas vigorosas y normales en todos los casos evaluados.

Mroginski y Scocchi (1998), al conservar meristemos de Paraíso (*Melia azedarach*) durante seis meses, obtuvieron que la reducción de las sales de MS hasta un 25% controlaba el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas, lográndose un 70% de regeneración. García *et al.* (1999), refirieron un retardo significativo del crecimiento cuando utilizaron las sales MS al 25% para conservar plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.).

CONCLUSIONES

Para la conservación *in vitro* de boniato, las dosis de 5.0 y 10.0 mg.l⁻¹ de ácido abscísico resultaron las más apropiadas.

El empleo de manitol aunque produjo la disminución del crecimiento, no resultó adecuado para la conservación *in vitro* a altas concentraciones, pues provocó la muerte y alteraciones morfológicas al material vegetal conservado.

La disminución de las sales MS (1962) al 25% y 50% resultó apropiado para la conservación *in vitro* de boniato, pues disminuyó el crecimiento de las plantas y mantuvo una alta supervivencia y recuperación del material vegetal conservado.

REFERENCIAS

Cuba. 1998. Instructivo Técnico para el cultivo del boniato. MINAGRIC. La Habana

García, L, Rodríguez M, Martínez Y, Sarría B y Pichardo T (1999) Aplicación de la Biotecnología en la conservación de los recursos

fitogenéticos de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. L. Híbrido). Libro de reportes cortos. V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. Villa Clara

Jarret, RL y Gawel N (1991) Abscisic acid induced growth inhibition of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 24: 13-18

Jarret, RL y Gawel N (1991 a) Chemical and environmental growth regulation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 25: 153-159

Lepoivre, PJ (1996) Production and Field Evaluation of Healthy micropropagated sweet potato. Development of resistant cultivars to virus complex by Plant Tissue culture. Final Report of Project. Gembloux. Belgium

Mroginski, LA y Scocchi AM (1998) Conservación de germoplasma de Paraíso (*Melia azedarach*) mediante cultivo de meristemos. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-497

Nodarse, O, Santana I, Cornides MT, Figueredo Y, Héctor E y Rodríguez R (1998) Comparación de poblaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana

Peralta, I.P (1920) El camote en el Perú: Producción, demanda actual y perspectivas agroindustriales. En: desarrollo de productos de raíces y tubérculos. Vol II. América Latina. P 111- 120

Roca, WM, Arias DL y Chávez R (1993) Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. En: Cultivos de tejidos en la agricultura; fundamento y aplicaciones, pp. 697-727. Publicaciones CIAT. Colombia

Sánchez, Y. M. Millian, A. Morales y F de la Fuente (1995) Prospección de recursos fitogenéticos de raíces y tubérculos tropicales en Cuba en 1991. Cultivos Tropicales 16 (1) 84-87

Suksa, P, Kataoka I, Fujime Y y Subhadrabandhu S (1997) Effect of temperature, growth retardants and osmotic potential on growth of papaya shoots *in vitro*. Japanese Journal of Tropical Agriculture. 41

Vázquez, T. E. y S. Torres. 1991. Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. La Habana

Wambugu, F (1995) Control of Africa Sweet Potato virus diseases through biotechnology and technology transfer. En: J. Komen, J. Cohen and Z. Ofin (Eds) Turning Priorities into Feasible Programs. Agricultural Biotechnology Policy Seminars 2: 75-76

Westcott, RJ (1981) Tissue culture storage of potato germplasm. Minimal growth storage. Potato Res. 24: 331-342

Ziv, MA. Schwartz y D. Fleminger 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro* implications for hardening. Plant Sci. 52 127 134