

Estudio sobre la efectividad del RIZOBAC en el proceso de callogenesis en papa var. Desiree

Jaime Ramiro Hidrobo Luna^{1*}, Eduardo Héctor Ardisana¹, Annia Hernández², *Autor para correspondencia.

¹ Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), Apartado 18-19, San José de las Lajas, Provincia La Habana. *hidroboluna@yahoo.es

² Departamento de Fitotecnia, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, CP 32 700. San José de las Lajas, Provincia La Habana, CUBA.

RESUMEN

Este experimento se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), con el objetivo de evaluar los efectos de diferentes concentraciones de un biopreparado cubano de origen rizobacteriano denominado RIZOBAC, en la obtención de mayor masa fresca y buenas características embriogénicas de callos *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum*, L.) var. Desiree, provenientes de vitroplántulas del género *Solanum*, del Banco de Germoplasma perteneciente al Departamento de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), así como valorar la posible sustitución de los reguladores del crecimiento tradicionales como el 2,4-D y la kinetina en los medios de cultivo ya establecidos para la calogénesis de este cultivo. Se estudiaron varios tratamientos, utilizando un medio de cultivo control, el cual no contenía estas sustancias bioactivas, además se sustituyó el 2,4-D (3.0 mg.l⁻¹) y la kinetina (0.5 mg.l⁻¹) con el RIZOBAC, en varias concentraciones (0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 mg.l⁻¹) y en otros casos adicionándolo al medio de cultivo control en las mismas concentraciones indicadas anteriormente. Se evaluó la masa fresca, los cambios de coloración, la textura y la consistencia de los callos. Se detectaron variaciones en las respuestas de los indicadores evaluados, obteniéndose los mejores resultados al utilizar 1.5 mg.l⁻¹ de RIZOBAC como sustituto de las auxinas; además se obtuvieron buenos resultados al incluir RIZOBAC a la misma concentración en el medio de cultivo que se venía utilizando para la inducción de calogénesis en la papa, el cual contenía los dos reguladores del crecimiento. Con la sustitución del 2,4-D y/o kinetina por el RIZOBAC se pueden ahorrar hasta 10cts USD por cada litro de medio de cultivo.

Palabras clave: biopreparados, callos, indicadores, *in vitro*, reguladores del crecimiento

ABSTRACT

This experiment was carried out in a plant biotechnology laboratory at Havana Agronomy University (UNAH), evaluating the effects of different concentrations of bacterial preparations (RIZOBAC) on the obtention of fresh mass and on embryogenesis characteristics of potato (*Solanum tuberosum*, L.) var. Desiree, callus *in vitro* obtained from the potato Germoplasm Bank of the Department of Genetics and Plant Improvement, at the National Institute of Agricultural Science (INCA) as well as to estimate the possible substitution of plant growth regulators such as 2,4-D and kynetine in the culture media, to establish callogenesis of this crop. Different treatments were studied employing the established crop media as the control treatment; besides, the substitution of the auxins (3.0 mg.l⁻¹) and cytokinins (0.5 mg.l⁻¹), with the bioactive complex (RIZOBAC) in different concentrations (0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 mg.l⁻¹), and in other cases adding to the control culture media, the same concentration. The fresh weight, colour changes, texture and consistence of the callus were evaluated. Variations were noted in the clone response as well as in the indicators. The best results were obtained using (1.5 mg.l⁻¹) RIZOBAC as a substitute for auxins. Favorable results were also obtained when the (RIZOBAC) at concentration of 1, 5 mg.l⁻¹ was included in the original culture media that contained the two plant growth regulators. More than 10cts USD could be saved per litre of culture media with the substitution of 2, 4-D for the RIZOBAC.

Keywords: biopreparates, callus, indices, *in vitro*, plant growth regulator

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*, L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes del mundo por sus múltiples beneficios (ocupa el cuarto lugar entre los alimentos más populares del mundo, después del arroz, trigo y maíz), además de ser muy utilizado como modelo agronómico en

múltiples ensayos relacionados con la micropropagación y el mejoramiento genético (Estévez, 1995). Los rendimientos en este cultivo han experimentado significativas afectaciones a causa de múltiples factores como las enfermedades, plagas y por las dificultades en la obtención y propagación de semilla por métodos tradicionales (Pérez *et al.*, 2001). La embriogénesis

somática es uno de los métodos más útiles de propagación masiva de plantas por su alta tasa de multiplicación, desarrollo y conversión de embriones somáticos en plantas (Montes *et al.*, 1995; Weger, 1998), llegando a convertirse en una alternativa para el aumento de la producción de semilla. La callogénesis es el primer paso hacia la consecución de embriones somáticos (Hernández *et al.*, 1999), pero debido a múltiples factores adversos al cultivo como la contaminación, microbiana mala manipulación del material inicial, condiciones del explante y por la falta de algún componente de los medios de cultivo como son los reguladores del crecimiento, su estudio y descripción se hacen complejos (Broks, 1994).

En el Departamento de Fisiología Vegetal el Grupo de Oligosacarinas perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de Cuba se ha obtenido un biopreparado de producción comercial denominado RIZOBAC (Hernández *et al.*, 1998a; Hernández *et al.*, 1998b) fue aislado a partir de bacterias de la rizósfera del maíz (*Zea mays*) var. Francisco y, después de varias pruebas se ha comprobado su efecto como biorregulador del crecimiento (Handam *et al.*, 1991; Hernández, 1998; Buyer *et al.*, 1999). Estas rizobacterias pertenecen al grupo de las *Pseudomonas*, Género *Pseudomonas cepacia*. Algunos autores como Hernández *et al.* (1998a); Hernández *et al.* (1998b) y Buyer *et al.* (1999), han considerado a la *Pseudomonas cepacia* como bacterias con capacidad de producir componentes promotores del crecimiento. Estos mismos autores aseguran que algunos de estos hechos son causados por el origen bacteriano que tienen estas sustancias, particularmente en la estimulación del crecimiento vegetal, por lo que pueden ser empleadas en más bajas concentraciones que aquellas empleadas convencionalmente. Estas sustancias pueden ser utilizadas por sus ventajas como biorreguladores en el desarrollo de plántulas *in vitro*. Además existe la posibilidad de la sustitución de las auxinas (2,4-D) y la citoquininas (kinetina), lo que disminuiría los costos de los medios de cultivo utilizados para micropropagar especies de gran importancia agrícola. Se ha demostrado que de esta forma es posible obtener plántulas a partir de explantes que pueden ser entrenudos, brotes apicales, axilares, etc. (Hernández, 1998).

Se ha incrementado la producción a gran escala de estas sustancias y su uso se ha generalizado en todo el país. Por todo lo expuesto se plantea como objetivo en este trabajo, emplear el RIZOBAC como posible sustituto de los reguladores del crecimiento 2,4-D y kinetina del medio de cultivo para inducción de callogénesis en la papa así como obtener callos con mayor masa fresca y buenas características embriogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), durante los meses de Noviembre - Diciembre del año 2000.

Los explantes que se utilizaron fueron los entrenudos de vitroplantas de 30 días de edad de la var. Desirée, provenientes del Banco de Germoplasma del Género *Solanum* perteneciente al Departamento de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Estos explantes se colocaron en frascos de cristal con cuatro medios de cultivo diferentes para inducir la formación de callos (MIC1, MIC2, MIC3 y MIC4) según lo descrito por Hernández *et al.* (1999) para el cultivo de la papa, tomando como base el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), suplementados con 3.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg.l⁻¹ de kinetina. Se colocaron tres entrenudos por frasco, y se adicionaron cuatro concentraciones de RIZOBAC (0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 mg.l⁻¹), quedando un tratamiento como control por cada medio de cultivo (1, 6, 11 y 16) a los que no se adicionó RIZOBAC (Tabla 1).

Los explantes se incubaron a una temperatura de 25±1°C, y bajo un fotoperíodo de 16h luz a una intensidad luminosa de 1200 lux.

Se realizaron 20 tratamientos con 30 repeticiones (explantes) por cada uno.

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- tiempo a partir del cual se inició la formación de callos (días)
- masa fresca (g), a los 35 días
- coloración de callos
- textura (según escala de Santana, 1995)
- consistencia
- porcentaje de contaminación microbiana (%)

Las evaluaciones se realizaron al final del experimento que tuvo un tiempo de duración de 40 días a partir del momento de la siembra de los explantes iniciales.

Los datos se procesaron según un análisis de varianza de clasificación simple, con diseño completamente aleatorizado. Las medias se compararon a través de la dócima de Duncan para el 5% de significación. Se hizo un estudio económico, el cual permitió establecer las posibles sustituciones del 2,4-D y la kinetina, utilizadas como reguladores del crecimiento y componentes básicos del medio de cultivo por el biopreparado cubano de producción comercial de origen bacteriano RIZOBAC, para esto se utilizó la siguiente información:

Tabla 1. Medios de cultivo diferentes para inducir la callogénesis en papa var. Desirée (cantidades indicadas para 1 litro de medio de cultivo)

	MIC ₁				MIC ₂				MIC ₃				MIC ₄							
1c	2	3	4	5	6c	7	8	9	10	11c	12	13	14	15	16c	17	18	19	20	
3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	-	-	-	-	-	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	-	-	-	-	-	
mg	mg	mg	mg	mg						mg	mg	mg	mg	mg						
2,4-D	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg											
KINETIN	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg											
A	-	0.5	1.0	1.5	2.0	-	0.5	1.0	1.5	2.0	-	0.5	1.0	1.5	2.0	-	0.5	1.0	1.5	2.0
mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
RIZOBAC	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
MIC: medio de cultivo para la inducción de callos										c: control										

Tabla 2.- Comparación de los costos del las auxinas (2,4-D), citoquininas (kinetina) y el RIZOAC, en diferentes concentraciones utilizados en el medio para inducir callogénesis en papa (MIC).

Producto	Concentración (mg.l ⁻¹)	Costo/litro de medio de cultivo	
		USD	USD
2,4-D	3,0	---	0,11
kinetina	0,5	---	0,12
RIZOBAC	0,5	0,01	0,02
RIZOBAC	1,0	0,03	---
RIZOBAC	1,5	0,04	---
RIZOBAC	2,0	---	---

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se pueden observar los resultados de los tratamientos realizados para la inducción de la callogénesis de la papa. Fue posible determinar que el tratamiento 19 a una concentración de RIZOBAC de 1.5 mg.l⁻¹ y sin la adición de los reguladores del crecimiento en el

medio de cultivo obtuvo una respuesta favorable en cuanto al aumento de masa fresca de los callos, diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos, inclusive de los tratamientos control resultados que fueron equivalentes con los obtenidos por Hebbar *et al.* (1994), Bashan *et al.* (1996) quienes utilizaron al cultivo del cafeto (*Coffea canephora*).

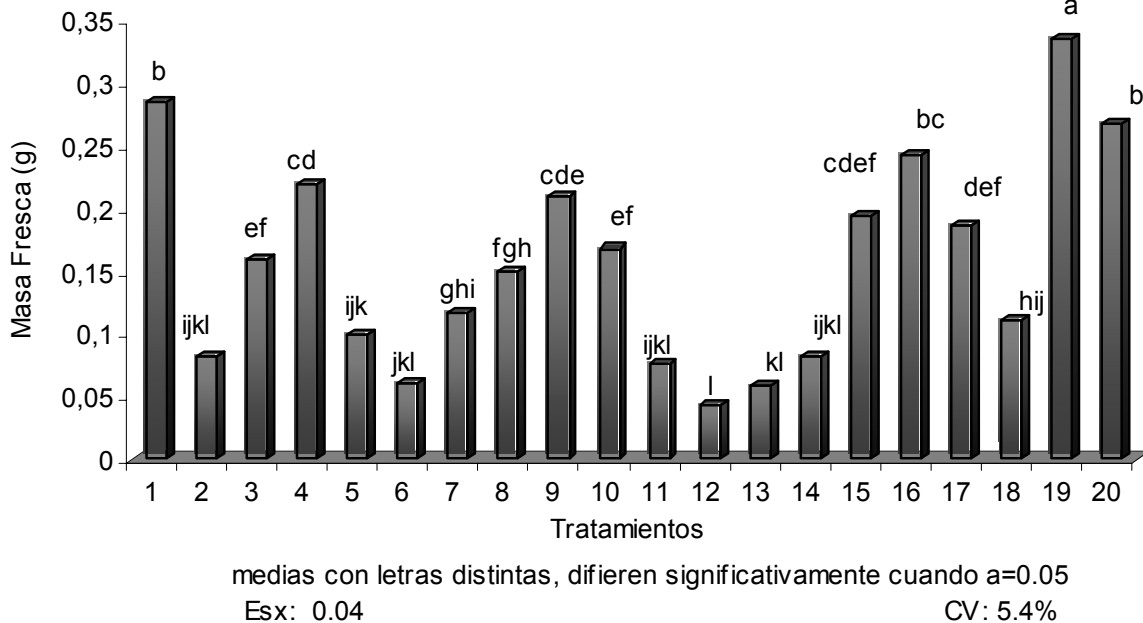


Figura 1. Efecto del RIZOBAC sobre la masa fresca de callos de *Solanum tuberosum* var. Desirée

Los callos en este tratamiento y al final del experimento tuvieron una masa fresca de hasta 0.34 C° y una coloración cremosa - marrón (nivel 4), de consistencia compacta y textura friable (nivel 4) (según escala de Santana, 1995); características éstas que permitieron identificar a callos con viabilidad embriogénica, aspecto importante para continuar con el proceso embriogénico. Estos resultados en cuanto a las características morfológicas de los callos, no difirieron significativamente del resto de tratamientos excepto a los que contenían RIZOBAC y la presencia en diferentes concentraciones de ambos reguladores del crecimiento (2,4-D y kinetina)

como componentes básicos de los medios de cultivo para inducir callos (MIC).

En esta misma figura se puede observar que los tratamientos que van del 7 al 10, en los cuales solamente se encontraba presente la kinetina y diferentes concentraciones de RIZOBAC, no tuvieron buenos resultados en cuanto se refiere a masa fresca de los callos, posiblemente debido al desbalance en las concentraciones de los reguladores del crecimiento comparándolos con el tratamiento 19. En la figura 2 se presenta un callo con buenas características embriogénicas típico del tratamiento 19 (1.5 mg.l⁻¹ de RIZOBAC).

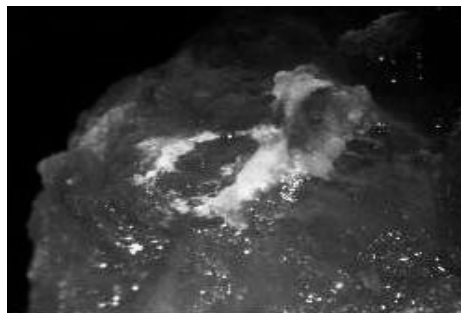


Figura 2.- Callo de papa var. Desirée a los 40 días en medio de cultivo MS suplementado con 1.5 mg.l⁻¹ de RIZOBAC.

En los tratamientos del 12 al 15 se obtuvo en general menor masa fresca que en los anteriores (6 al 10), aunque el 15 a una concentración de 2.0 mg.l⁻¹ de RIZOBAC y 3.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D mostró una respuesta favorable a su aplicación ya que los callos en este tratamiento obtuvieron buenas características embriogénicas en cuanto a masa fresca, coloración, textura y consistencia y que según la misma escala anterior van de tres a cuatro. Algunos de estos resultados han sido demostrados de similar manera en papa (*Solanum tuberosum*, L.) por Bashan (1996) quien trabajó con compuestos microbianos análogos a los utilizados en este trabajo.

Finalmente se distinguió que dentro de los tratamientos que van desde el 16 al 20, este último, a una concentración de RIZOBAC de 2.0 mg.l⁻¹ y sin reguladores del crecimiento, respondió favorablemente a la aplicación de este biopreparado, en cuanto a sus características morfológicas se refiere, aunque en cuanto a masa fresca estaba muy por debajo del tratamiento 19 (1.5 mg.l⁻¹) no se diferenció significativamente al compararlo con el tratamiento control (16). Weger (1998) realizó varios ensayos en el cultivo del tomate (*Lycopersicum esculentum*) utilizando rizobacterias y obteniendo buenos resultados al utilizar una concentración de 1.8 mg.l⁻¹; asimismo se observó en este mismo medio de cultivo que el tratamiento 18 no respondió favorablemente a la aplicación RIZOBAC donde se obtuvieron callos de menor calidad embriogénica como se observa en la Figura. 3.

Los resultados obtenidos referentes a la influencia de las distintas variables sugirieron que el medio de cultivo fue también determinante para una actividad favorable del RIZOBAC, de esta manera se confirmó la existencia de una interacción de este biopreparado con el 2,4-D y

la kinetina, respectivamente, ya que su actividad fue más favorable cuando estaban presentes a la misma vez o ausentes los dos reguladores del crecimiento, como se pudo determinar en este experimento. Todo esto se debe a que el RIZOBAC en su constitución posee elementos auxínicos y citoquinínicos (Hernández *et al.*, 1998a). También sucede este tipo de desbalance de los reguladores del crecimiento cuando se adiciona RIZOBAC al medio de cultivo que contiene solamente uno de los dos, debiéndose tomar en cuenta la concentración de estas auxinas y citoquininas. En este caso, los mejores resultados se obtuvieron cuando se aplicó al medio de cultivo RIZOBAC a una concentración de 1.5 mg.l⁻¹ (tratamiento 19), 2.0 mg.l⁻¹ (tratamiento 20) y 3.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, y se llegó a determinar que este biopreparado posee características semejantes más a las auxinas que a las citoquininas.

Los mejores resultados obtenidos en este experimento confirmaron que en ausencia del 2,4-D y kinetina en el medio de cultivo, la acción auxínica del RIZOBAC produjo un efecto favorable y se lograron buenos resultados en la producción y aumento de masa fresca y del resto de las características morfológicas. Estos resultados coincidieron con los alcanzados por Basham *et al.* (1996), quienes realizaron estudios sobre el contenido auxínico de algunas rizobacterias aisladas de gramíneas.

Los resultados donde se obtuvieron callos con poca masa fresca se debieron a múltiples factores que afectaron a los distintos tratamientos mientras pasaban este período en el cuarto de incubación, sobre todo lo relacionado con la no formación de callos debido al desbalance de las auxinas y citoquininas presentes en el medio de cultivo, causado por falta de interacción entre los dos reguladores del crecimiento utilizados (Parke, 1991).

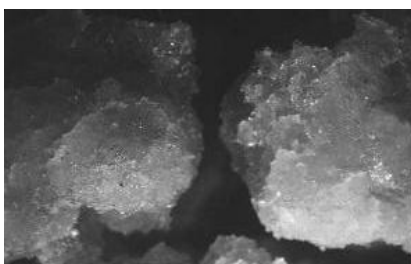


Figura 3.- Callos de papa var. Desirée a los 40 días en el medio de cultivo MS suplementado con Kinetina (0.5 mg.l⁻¹) y 2,4 D (3.0 mg.l⁻¹) (control).

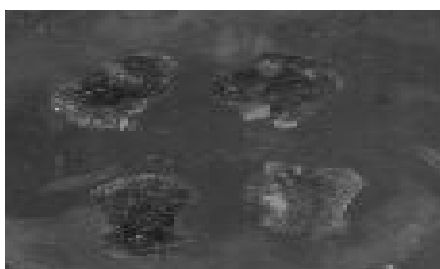


Figura 4.- Callos de papa var. Desirée con menor masa fresca en el medio de cultivo MS suplementado con (2.0 mg.l⁻¹) a los 40 días.

El tejido de cicatrización apareció a los 10 días de haber sido sembrados los explantes iniciales (Figura. 5) dos días

antes que en los explantes que se encontraban en el medio de cultivo sin este biopreparado (Tratamiento 1).

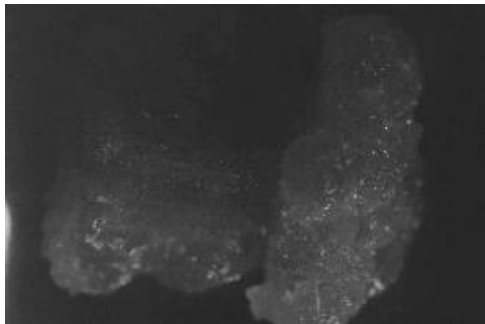


Figura 5. Tejido de cicatrización en el explante inicial de *Solanum tuberosum* var. Desiree a los 10 días de cultivo en presencia de RIZOBAC.

De 200 frascos (dos explantes por frasco) solamente tres se contaminaron; de esta manera se disminuyó el porcentaje de contaminación de los medios de cultivo, que en trabajos realizados anteriormente se obtuvo hasta un 10% de contaminación se logró disminuir a 1.5%, al utilizar el RIZOBAC, esto debido quizás la capacidad que tienen las rizobacterias de formar sideróforos, (Hernández, 1998), lo que brinda resistencia al ataque de microorganismos. Resultados equivalentes fueron obtenidos en el cultivo del café (*Coffea canephora* P.) (González *et al.*, 1999).

El RIZOBAC, al ser aplicado a un medio de cultivo para inducción de callogénesis (MIC) a concentraciones medias de 1.5 y 2.0 mg.l⁻¹ en ausencia de otros reguladores del crecimiento como las auxinas (3.0 mg.l⁻¹ 2,4-D) y citoquininas (0.5 mg.l⁻¹ kinetina), produjo los mayores valores de masa fresca y callos con mejores características callogénicas y viabilidad embriogénica como son la coloración marrón, consistencia compacta y textura friable, además de disminuir la contaminación exógena de los medios de cultivo.

REFERENCIAS

Bashan, Y, Holguín G y Ferrera-Cerrato R (1996) Interactions between Plants and Beneficial Microorganisms. Terra, México. 14(2): 112-121

Broks, T (1994) Biology of microorganisms. Seven editions, New Jersey. 908 p.

Buyer, J, Wright J y Leong, J (1999) Structure of Pseudobatin A214, a siderophore from a bean-deleterious *Pseudomonas*. Biochemistry. 25(2): 2492-5499

Estévez, A (1995) Conferencia sobre Recursos Fitogenéticos en papa (*Solanum tuberosum*, L.). INCA, San José de las Lajas. 75p.

González, M, Santana N, Hernández A y Santander J (1999) Use of the bacterial compound BC-1 in the micropropagation of *Coffea canephora*, var. Robusta. Cultivos Tropicales. 20(3): 21-24

Hamdan, H, Weller D y Thonashow L (1991) Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. Tritici by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. Appl. Environ. Microbiol, 1(57): 3270-3277

Hebbar, K, Martel M y Heulin, T (1994) *Burkholderia cepacia*, a plant growth promoting rhizobacteria associate of maize. Proceedings of the Third International Workshop on PGPR. p. 201-203

Hernández, A (1998) Caracterización de cepas de *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens* aisladas de la rizósfera del maíz (*Zea mays*). [Tesis de Maestría] Universidad de la Habana, 123p.

Hernández, A, Fernández A y Hernández A N (1998^a) Identificación de cepas de *Pseudomonas cepacia*, aisladas de la rizósfera del maíz (*Zea mays*). Cultivos Tropicales. 19(1): 14-16

Hernández, A, Hernández A N y Heydrich M (1998b) Selección de cepas de *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens*, efectivas en la biofertilización del maíz (*Zea mays*). Cultivos Tropicales. 19(3): 5-9

Hernández, M, Hidrobo J y Araujo B (1999) Proceso de Embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum*, L.). En: Memorias del IX Seminario Científico del INCA, San José de las Lajas, p. 12-13

Montes, S, Cevallos A y López M (1995) Callogénesis en el café (*Coffea canephora*) var. Robusta. Cultivos Tropicales. 21(3): 23-24

Parke, J (1991) Root colonization by *indigenus* and introduced microorganisms. En: rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Pub. p 33-42. Dordrech

Pérez, N, de Fera M, Jiménez E, Capote A, Chávez M y Quiala E (2001) Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de (*Solanum tuberosum*, L.) var. Atlantic y estudio de su comportamiento en el campo. Biotecnología Vegetal, 1(1): 17-21

Santana, N (1995) Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea* sp.) Tesis de Grado (Doctor en Ciencias Agrícolas). INCA, San José de las Lajas. 124p.

Weger, L (1998) Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant beneficial *pseudomonas*. Microbiol. Ecol. 17(1): 221-228