

## Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo

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

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

### RESUMEN

Segmentos nodales de plantas *in vitro* de boniato de los clones INIVIT B-88, CEMSA 78-354, INIVIT B-90-510 y Cautillo fueron conservados durante un año en medio de cultivo con 10.0 mg.l<sup>-1</sup> de ácido abscísico con altos porcentajes de supervivencia y recuperación. La reducción de la temperatura de conservación a 17 ± 2°C disminuyó la velocidad de crecimiento en todos los clones estudiados y permitió su conservación durante un año manteniendo altos porcentajes de supervivencia. La disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo hasta un 50% no redujo significativamente la velocidad de crecimiento con respecto al medio de cultivo control, no pudiéndose conservar los clones evaluados por un tiempo superior a los seis meses en estas condiciones.

Palabras clave: biodiversidad, conservación, *Ipomoea batatas*, recursos fitogenéticos

### ABSTRACT

Nodal segment of INIVIT B-88, CEMSA 78-354, INIVIT B-90-510 and Cautillo sweet potato *in vitro* plants clone were conserved for one year in culture medium with abscisic acid 10.0 mg.l<sup>-1</sup> with high survival and recovery percentages without subculture to fresh medium. Reducing of conservation temperature to 17 ± 2°C decreased the rate growth in all clone and possibility their conservation for one year with high survival percentages. The reduction of salt concentration of culture medium to 50% did not decrease the rate growth in relation with a standard culture medium for this was impossible to conserve the sweet potato clones for a period over six month in this conditions.

Key words: biodiversity, conservation, *Ipomoea batatas*, phylogenetic resources

### INTRODUCCIÓN

El boniato *Ipomoea batatas* (L.) Lam. ocupa el sexto lugar entre los cultivos más importantes a escala mundial y el tercero entre las raíces y tubérculos (Jarret, 1991), destacándose por su alta rusticidad, ciclo corto, capacidad para adaptarse y producir rendimientos apreciables bajo diversas condiciones climáticas y de suelo. En Cuba, el boniato puede plantarse en casi todas las regiones, siendo una vianda muy estimada por la mayoría de la población. La mayor colección de este cultivo en Cuba se encuentra en el Instituto de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en Santo Domingo, Villa Clara con alrededor de 625 clones y 13 especies (Rodríguez *et al.*, 1996), donde se conserva en bancos de semilla en el campo fundamentalmente. Sin embargo, en esta forma de conservación se presentan una serie de dificultades como son: se requiere plantar todas las accesiones dos veces al año por ser un cultivo de ciclo corto, es necesario una constante rotación de los terrenos dedicados a la siembra con el fin de evitar la mezcla de variedades debido a la brotación espontánea de los restos de cosechas anteriores o la aparición de plantas provenientes de semillas botánicas, sumado a esto las plantaciones están expuesta a la pérdida por enfermedades, plagas o desastres naturales (Rodríguez *et al.*, 1996). La conservación *in vitro* se ha perfilado como una alternativa valiosa para

la conservación de germoplasma de especies de propagación vegetativa, siendo muy útil y eficiente para la distribución de material vegetal clonal, pues facilita disponer de este a un mismo tiempo, evita la transferencia de enfermedades y patógenos y posibilita la erradicación de virus a través del cultivo de meristemas (Roca *et al.*, 1979). Varias biotécnicas han sido empleadas para la conservación de germoplasma, estas incluyen la crioconservación (Towill, 1981), la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo (Debabrata y Naik, 1998, Mandall y Chandell, 1996) y la conservación de DNA (Peacock, 1986). Roca *et al.* (1993) plantearon que la conservación *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar o suprimir totalmente el crecimiento de las células y tejidos: el objetivo es aumentar al máximo el periodo de transferencia del cultivo o extenderlo infinitamente. La adición de agentes osmóticos, reguladores del crecimiento y la disminución de la temperatura de incubación han sido muy eficiente en la reducción de la velocidad de crecimiento de diferentes especies de plantas (Dodds y Roberts, 1985). La extensión práctica de una metodología de conservación *in vitro* no sólo depende de su capacidad para reducir la velocidad de crecimiento de las plantas, sino también de que pueda ser aplicada con éxito a un amplio número de accesiones o clones. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el

comportamiento de diferentes clones de boniato conservados *in vitro* bajo condiciones de crecimiento mínimo durante un año.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon como explantes segmentos nodales de aproximadamente 2.0 cm de longitud de plantas *in vitro* de boniato de los clones INIVIT B-88, CEMSA 78-354, INIVIT B-90-510 y Cautillo, mantenidas mediante subcultivos cada seis semanas en medio de cultivo de multiplicación constituido por las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), complementadas con ácido giberélico 10.0 mg.l<sup>-1</sup> ácido indolacético (AIA) 0.05 mg.l<sup>-1</sup> tiamina 1.0 mg.l<sup>-1</sup>, mioinositol 100.0 mg.l<sup>-1</sup> y sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>.

El medio de cultivo basal para todos los experimentos fue el constituido por las sales MS complementadas con mioinositol 100.0 mg.l<sup>-1</sup>, tiamina 1.0 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30.0 g.l<sup>-1</sup>. En el primer ensayo se añadió al medio de cultivo basal ácido abscísico (10.0 mg.l<sup>-1</sup>), en el segundo ensayo segmentos nodales cultivados en el medio de cultivo basal fueron incubados a 17 ± 2°C de temperatura y en el tercer ensayo se emplearon las sales MS al 50% de su concentración. Como control se emplearon segmentos nodales cultivados en medios de cultivo basal e incubado a 25 ± 2°C. El pH de todos los medios de cultivo fue ajustado a 5.7, se solidificaron con Phytigel 2.5 g.l<sup>-1</sup> y se distribuyeron a razón de 10 ml en tubos de ensayo de 2.0 cm de diámetro y 15.0 cm de largo, después de ser esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 150 kPa. En cada tratamiento se cultivaron 30 explantes, a razón de uno por tubo de ensayo. Los cultivos fueron incubados a

25 ± 2°C de temperatura (excepto en el segundo ensayo), intensidad luminosa de 36-45 m mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y humedad relativa de 70% a 80%. Las variables: Porcentaje de supervivencia, recuperación, longitud del tallo, número de raíces y número de yemas por planta se evaluaron a los 12 meses de cultivo. Para evaluar la recuperación las plantas *in vitro* fueron cultivadas en medio de cultivo basal al que se adicionó ácido giberélico 10.0 mg.l<sup>-1</sup> y AIA 0.05 mg.l<sup>-1</sup> e incubadas a 25 ± 2°C, intensidad luminosa de 36-45 m mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y humedad relativa de 70 a 80%. Los datos fueron transformados por la ecuación  $\sqrt{x+0.5}$  y se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación doble. Cuando existieron diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey para el 0.05 de probabilidad del error. Se utilizó el sistema estadístico Statistica sobre Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los criterios a tener en cuenta al decidir la validez de una metodología para la conservación *in vitro* de especies vegetales, se encuentran el porcentaje de supervivencia y recuperación del material vegetal conservado. En la tabla 1 se puede observar que, aunque existieron diferencias entre los clones, tanto la supervivencia como la recuperación se mantuvieron altas en todos los tratamientos durante el periodo de conservación, observándose después de transcurridos 12 meses plantas saludables, sin síntomas que indicaran la necesidad de cultivarlas en medio de cultivo fresco, por lo que se infirió que el periodo de conservación pudo extenderse por un tiempo superior a los 12 meses.

Tabla 1. Comportamiento de la supervivencia y recuperación de plantas *in vitro* de boniato de diferentes clones conservadas durante un año empleando ácido abscísico 10.0 mg.l<sup>-1</sup>.

Clones	Supervivencia (%)		Recuperación (%)	
	6 meses	12 meses	6 meses	12 meses
INIVIT B-88	100	98.5	100	100
CEMSA 78-354	100	95.5	100	98.5
Cautillo	100	85.5	100	100
INIVIT B-90-510	95.5	90.0	100	97.5

Los resultados obtenidos confirmaron la efectividad del ácido abscísico para la conservación *in vitro* de boniato. Resultados también positivos al emplear este regulador del crecimiento para la conservación *in vitro* fueron obtenidos por Desamero (1990); Jarret (1991) quienes conservaron plantas *in vitro* de boniato en medios de cultivo a los que se adicionó ácido abscísico en concentraciones de 5-20 mg.l<sup>-1</sup> durante 8 a 12 meses alcanzando supervivencias de 70 a 80%.

La reducción de la velocidad de crecimiento del material vegetal conservado, constituye uno de

los aspectos básicos de la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo, por lo que es muy importante la evaluación del comportamiento de variables del crecimiento al escoger el método de conservación adecuado. El ácido abscísico actúa como un inhibidor de la síntesis de las giberelinas (Vázquez, 2001), provocando la inhibición del crecimiento de las plantas e induciendo el reposo o letargo de las yemas, debido a este efecto, ha sido el regulador del crecimiento más ampliamente utilizado en la conservación *in vitro* de plantas.

El análisis de varianza para cada una de las variables evaluadas (Tabla 2) mostró una interacción significativa entre los factores (clones y concentración de ácido abscísico. Se puede observar que al emplear el ácido abscísico 10.0

mg.l<sup>-1</sup>, el crecimiento de las plantas *in vitro* fue prácticamente inhibido en todos los clones, observándose una drástica reducción en el número de yemas y raíces, así como en la longitud de las plantas *in vitro*.

Tabla 2. Efecto del ácido abscísico sobre diferentes clones de boniato conservado *in vitro* durante un año.

Variables	Acido abscísico (mg.l <sup>-1</sup> )	Clones				Coeficiente de variación
		INIVIT B-88	CEMSA 78-354	Cautillo	INIVIT B-90-510	
Número de yemas por planta	0.0	9.40 b	12.86 a	8.25 b	12.25 a	11.7 %
	10.0	1.55 c	1.75 c	1.45 c	1.80 c	
Número de raíces por planta	0.0	3.45 b	3.65 ab	4.10 a	4.71 a	14.5 %
	10.0	1.53 c	1.64 c	1.83 c	1.42 c	
Longitud (cm)	0.0	7.87 ab	8.08 a	7.27 b	8.18 a	15.8 %
	10.0	0.70 c	0.55 c	0.84 c	0.64 c	

Los datos correspondientes a 0.0 mg.l<sup>-1</sup> de ácido abscísico fueron tomados a los seis meses después de la siembra.

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según Tukey ( p < 0.05)

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los de Desamero (1990) quien logró la conservación *in vitro* de plantas de boniato durante ocho meses utilizando ácido abscísico en concentraciones de 5 a 20 mg.l<sup>-1</sup>, observando un fuerte efecto fenotípico, así mismo, Jarret y Gawell (1991) lograron conservar segmentos nodales de boniato durante un año empleando ácido abscísico 10.0 mg.l<sup>-1</sup> en el medio de cultivo. La conservación *in vitro* de otras especies empleando ácido abscísico muestra también su efecto inhibitorio del crecimiento, tales son los resultados obtenidos por Suksa *et al.* (1997), quienes observaron la inhibición del crecimiento en segmentos nodales de papaya cuando fueron

cultivados en medios de cultivo que contenían 5.0 y 10.0 mg.l<sup>-1</sup> de ácido abscísico.

La disminución de la temperatura de incubación ha sido el factor que con mayor éxito se ha empleado en la conservación de diferentes especies *in vitro* (Marino *et al.*, 1985; Monette, 1988, Jarret y Gawell, 1991a), el cual depende de la especie en cuestión. Como puede observarse en la tabla 3, la supervivencia del material vegetal conservado a 25±2°C fue nula, pues todas las plantas murieron antes de los 12 meses al no ser cultivadas en medio de cultivo fresco, sin embargo, cuando se incubaron a 17±2°C se obtuvo una supervivencia superior al 60% en todos los clones, valores que estuvieron en dependencia del clon empleado.

Tabla 3. Efecto de la temperatura de incubación en diferentes clones de boniato conservados *in vitro* durante un año.

Variables	Temperatura (°C)	Clones				Coeficiente de variación
		INIVIT B-88	CEMSA 78-354	Cautillo	INIVIT B-90-510	
Supervivencia (%)	17±2	75.5	62.6	66.5	86.5	
	25±2	0.0	0.0	0.0	0.0	
Número de yemas por planta	17±2	1.73 e	5.10 d	1.89 e	1.50 e	11.7 %
	<sup>1</sup> 25±2	9.40 b	12.86 a	8.25 b	12.25 a	
Número de raíces por planta	17±2	1.92 e	3.28 cd	2.75 d	5.50 b	14.5 %
	<sup>1</sup> 25±2	3.45 bc	3.65 b	4.10 a	4.71 a	
Longitud (cm)	17±2	1.43 d	3.34 c	1.78 d	1.62 d	15.8 %
	<sup>1</sup> 25±2	7.87 b	8.08 a	7.27 b	8.18 a	

Los datos correspondientes a 25±2°C fueron tomados a los seis meses después de la siembra.

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según Tukey ( p < 0.05)

El análisis de varianza realizado (Tabla 3) indicó una interacción altamente significativa entre los factores (clon X temperatura) para las variables número de yemas por planta, número de raíces por planta y longitud. Como puede observarse en esta tabla 3, el valor de todas las variables fue significativamente menor cuando las plantas *in vitro* fueron incubadas a  $17\pm 2^\circ\text{C}$ , destacándose las variables longitud de las plantas y número de yemas, en las cuales la disminución de la temperatura provocó una marcada depresión de sus valores con respecto a las conservadas a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . Se pudieron apreciar además, diferencias muy significativas en los valores de las variables para cada uno de los clones, esto indicó un comportamiento diferente de los genotipos en las condiciones de temperatura evaluadas. El boniato ha sido referido como una especie sensible a temperaturas inferiores a  $14^\circ\text{C}$  cuando se almacena por periodos prolongados (Roca, 1979), sin embargo se ha logrado su conservación exitosa a temperaturas entre  $16\text{-}18^\circ\text{C}$  por periodos de un año. Jarret y Gawell (1991a) lograron la conservación durante ocho meses de segmentos

nodales de boniato a temperatura de  $22^\circ\text{C}$ . La conservación de especies vegetales tropicales *in vitro* empleando bajas temperaturas ha sido obtenida con éxito además en *Ficus* (Withers, 1982), *Musa* (Banerjee y De Langue, 1985) y *Papaya* (Suksa *et al.*, 1997).

La disminución del contenido mineral en los medios de cultivo favorece el retardo del crecimiento debido a alteraciones que ocurren en el metabolismo celular. Al evaluar el efecto de la concentración de sales inorgánicas del medio de cultivo en los clones conservados *in vitro* (Tabla 4) no se observaron diferencias entre los tratamientos. Después de transcurridos seis meses de conservación las plantas habían agotado todo el medio de cultivo, las hojas comenzaron a tomar un color amarillo y a caer, por lo que fue necesario subcultivarlas a medio de cultivo fresco. Estos resultados indicaron que la disminución de la concentración de las sales hasta un 50% no fue suficiente para provocar un retardo apreciable del crecimiento que permitiera la conservación *in vitro* por un periodo mayor a los seis meses.

Tabla 4. Efecto de la disminución de la concentración de las sales inorgánicas del medio de cultivo en diferentes clones de boniato conservado *in vitro* durante seis meses.

Variables	Concentración de sales inorgánicas (%)	Clones				Coeficiente de variación
		INIVIT B-88	CEMSA 78-354	Cautillo	INIVIT B-90-510	
Número de yemas	100	9.40 ab	12.86 a	8.25 b	12.25 ab	24.9 %
	50	8.70 ab	12.17 a	7.75 b	11.89 ab	
Número de raíces	100	3.45 b	3.65 b	4.10 b	4.71 a	16.1%
	50	2.43 c	3.46 b	3.17 b	4.03 a	
Longitud (cm)	100	7.87 ab	8.08 a	7.27ab	8.18 b	29.6%
	50	7.14 b	8.04 a	6.76 b	7.59 ab	

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según Tukey ( $p < 0.05$ )

Estos resultados no coincidieron con los obtenidos por Espinosa *et al.* (2002) al conservar segmentos nodales del clon de boniato Jewell, quienes obtuvieron una reducción apreciable del crecimiento cuando se disminuyó la concentración de las sales inorgánicas al 50 y 25%. Varios autores han empleado con éxito la disminución de la concentración de los nutrientes del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de especies vegetales, tales son los casos de Mroginski y Scocchi (1998) quienes al conservar meristemas de Paraíso (*Melia azedarach*) observaron que la reducción de la concentración de las sales hasta un 25% controlaba el crecimiento y desarrollo de las plantas. Así mismo García *et al.* (1999) lograron un retardo significativo en el crecimiento cuando utilizaron las sales MS al 25% para conservar plantas *in vitro* de caña de azúcar.

## CONCLUSIONES

Plantas *in vitro* de boniato de los clones INIVIT B-88, CEMSA 78-354, Cautillo e INIVIT B-90-510 cuando son conservadas en medio de cultivo  $10.00\text{ mg.l}^{-1}$  de ácido abscísico o incubadas a una temperatura de  $17\pm 2^\circ\text{C}$ , manifiestan una fuerte disminución en su crecimiento, pero mantienen altos porcentajes de supervivencia y recuperación.

Plantas *in vitro* de boniato de los clones INIVIT B-88, CEMSA 78-354, Cautillo e INIVIT B-90-510 manifiestan un retardo en su crecimiento durante los primeros seis meses de conservación en medio de cultivo donde se han reducido sales inorgánicas al 50% de su concentración, pero transcurrido este periodo recuperan su ritmo normal de crecimiento.

## REFERENCIAS

- Banerjee, N y De Langué E (1985) A tissue cultures technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (Banana and plantain). *Plant Cell Report* 4: 351-354
- Debabrata, S y Naik, PS (1998) Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica* 102 (2): 275-280
- Desamero, NV (1990 ) Minimal growth storage for *in vitro* germplasm conservation of sweet potato ( *Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Ph D Thesis Clemson University Press. Cambridge
- Dodds, JH y Roberts LW (1985) Experiments to plant tissue culture. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press
- Espinosa, A, Salas L, González O y Silva J (2002) Empleo de ácido abscísico, manitol y la disminución de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. *Biotecnología Vegetal* 2 (1): 49-42
- 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. híbrido). Libro de Reportes Cortos. V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. Villa Clara
- Jarret, RL y Gawell 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 Gawell, 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
- Jarret, RL (1991) Cultivo de Tejidos de Camote. Publicaciones CIAT. Colombia. 20 p. Cali
- Mandall, BB y Chandel KPS (1996) Conservation of genetic diversity in sweet potato and yams using *in vitro* strategies. En: Mandall BB (Eds) *Tropical Tuber Crops: problems, prospect and future strategies*. pp. 49-54. Science Publishers Inc.
- Marino, G, Paskuale R y Fabrizio S (1985) Storage of *in vitro* culture of *Prunus* root-stocks. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 5: 73-78
- Monette, PL (1988) Grapevine (*Vitis vinifera* L.) En: Bajaj, YPS (Eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 6 pp. 3-37. Springer Verlag
- Withers, LA (1982) Institute working on tissue culture for genetic conservation. A revised list. IBPGR Secretariat. Rome
- Mroginski, LA y Scocchi AM (1998) Conservación de germoplasma de Paraíso (*Melia azedarach*) mediante cultivo de meristemas. 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 bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Peacock, WJ (1986) The impact of Molecular Biology on Genetics Resources. En: Holden, JHW y Williams JT (Eds) *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*, pp. 268-276. George Allen and Unwind, London
- Roca, WM, Bryan J y Roca MR (1979) Tissue culture for international transfer of potato genetic resources. *Am. Potato Journal* 56 (1) 1-10
- Towill, LE (1981) *Solanum tuberosum*: a model for studying the cryobiology of shoot tips in the tuber bearing *Solanum* species. *Plant Sci. Lett.* 20: 315-324
- Roca, WM, Arias DL y Chávez R (1993) Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. En: Roca WM. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura; Fundamento y Aplicaciones*, pp. 697-727. CIAT. Cali
- Rodríguez, S, García M, Milián M y Sánchez I (1996) Establishment and use under field condition of Cubans germplasm of tropical root and tuber crops, and banana plantain. En: *Management of field and in vitro germplasm collection. Proceeding of a consultation meeting.* 15-20 January. IPGRI. Rome. Italy
- Suksa- Ard P, Kataoka I, Fujime Y Subhadrabandhu S (1997) Effect of temperature, growth retardant and osmotic potential on growth of papaya shoots conserved *in vitro*. *Japanese Journal of Tropical Agriculture* 41 (1): 7-13
- Vázquez, TE (2001) Hormonas Vegetales En: Vázquez TE y Torres S (ed) *Fisiología Vegetal*. pp 366. La Habana.