

Efecto de una formulación de propóleo en los medios de cultivo para la micropropagación de la papa var Desirée

Felipe Alberto Jiménez Terry^{1*}, Yanien Reyes Vergara², Edisleidy Aguila Jiménez², Daniel Agramonte Peñalver¹, Raúl Barbón Rodríguez¹, Raúl Collado López¹, Martha Pérez Peralta¹, Odalis Gutiérrez Martínez¹, Daymí Ramírez Aguilar¹, Rafael Sosa Martínez², Remigio Cortés Rodríguez². *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. felipe@ibp.co.cu

² Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830

RESUMEN

Con la intención de acelerar el crecimiento de las plantas en el cultivo *in vitro*, se han estudiado diferentes alternativas entre las que se encuentran el manejo de las condiciones de cultivo y la aplicación de sustancias estimuladoras del crecimiento a los medios de cultivo. El propóleo es un producto de origen natural, a partir de la miel de las abejas; que posee compuestos con una variada actividad biológica, pero aún no se conoce bien la influencia de su aplicación en el crecimiento y desarrollo de las plantas. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de una formulación del propóleo en los medios de cultivo para la micropropagación de la papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Desirée. Se determinó el efecto fitotóxico de este producto en la fase de multiplicación *in vitro* y además, se evaluó su acción sobre las plantas *in vitro* en la fase enraizamiento y en la fase de aclimatización. Se observaron alteraciones en las variables evaluadas a las plantas *in vitro* en fase de multiplicación cuando se añadió al medio de cultivo el propóleo desde 80ppm hasta 200ppm lo que indicó fitotoxicidad de la formulación. Sin embargo, a la concentración de 70ppm las plantas *in vitro* alcanzaron resultados superiores al control en las variables evaluadas, durante todas las fases de la micropropagación.

Palabras clave: aclimatización, enraizamiento, multiplicación

ABSTRACT

In the efforts to improve the quality of the plants in the *in vitro* culture, different alternatives have been tested and put into practice going from the increasing of the asepsis measures, chemical treatment of the plants donors, to the subculture of plants in cultures media with antimicrobial products of synthetic or natural origin. At the Institute of Plants Biotechnology, at the Central University of Las Villas, the influence of a formulation of propolis was evaluated on the growth and multiplication of *in vitro* plants of potato (*Solanum tuberosum* L.) from Desirée variety. The phytotoxic effect of this product in culture media was determined in the *in vitro* multiplication phase, and dilutions of the propolis were made to obtain concentrations from 1 to 200 ppm in ranges of 10 units. After the phytotoxic evaluation the adequate propolis working dose was applied during three subcultures in the *in vitro* multiplication phase in a comparative way with two treatments; culture medium elaborated with ebullition methods for five minutes. A subculture was also carried out in the *in vitro* rooting phase and the behavior of these plants in the acclimatization phase was evaluated. Alterations in levels superior to 80 ppm were observed in the morphologic variables evaluated. The treatment with the formulation of propoli presented significantly superior results than control.

Key words: acclimatization, multiplication, rooting

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos con mayores requerimientos tecnológicos para la producción de semilla, pues es afectada por hongos, bacterias, virus y viroides. Estos microorganismos ocasionan grandes daños en las plantaciones y en muchos casos provocan la descalificación de los tubérculos para ser utilizados como semilla (Agramonte, 2000).

Debido a que los métodos convencionales de propagación de plantas no garantizan la disminución de las enfermedades que afectan a la papa, la

producción de plantas *in vitro* y microtubérculos mediante técnicas biotecnológicas se ha convertido en una de las vías más eficientes para su propagación. Sin embargo, existen dificultades con la uniformidad y calidad de las características morfogénicas de las plantas durante las etapas *in vitro*. (Jiménez *et al.*, 2004). Es por ello que se desarrollan investigaciones diversas relacionadas con la aplicación de elicitores y bioestimuladores del crecimiento que pueden incrementar su calidad (Kowalski *et al.*, 2003).

El propóleo es un compuesto heterogéneo formado por flavonoides, coumarinas, terpenoides, fenoles,

taninos y muchas otras sustancias, la mayoría de las cuales se encuentran fundamentalmente en las plantas (Asis, 1991). No se conoce si algunas de ellas pueden intervenir en los mecanismos biológicos del crecimiento de las plantas *in vitro*, y provocar efectos positivos o adversos.

La papa (*Solanum tuberosum* L) es un cultivo de ciclo corto y muy sensible a las aplicaciones exógenas de compuestos que actúan como reguladores del crecimiento (Kowalski *et al.*, 1999). Las características de este cultivo hicieron posible observar el efecto de la aplicación del propóleo en los medios de cultivo para su micropropagación, lo cual constituyó el objetivo de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación de propóleo

Se utilizó una formulación de una solución alcohólica de propóleo al 12 % suministrada por el apiario de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. A este producto se le evaporó el solvente hasta obtener un residuo seco y se preparó una dispersión sólida en polietilenglicol 400 (Fluka) al 12%. El medio de cultivo se sometió a ebullición durante 5 min, después se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta 70 °C, y se le añadió el propóleo.

Material vegetal y recipientes de cultivo

Para la ejecución de los experimentos se utilizaron plantas *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad Desirée procedentes del tercer subcultivo en el Banco de Germoplasma *in vitro* del Instituto de Biotecnología de Las Plantas (IBP).

Se utilizaron como recipientes de cultivo frascos biotecnológicos de polipropileno de 600 ml de capacidad. En los mismos se colocaron los explantes; constituidos por un segmento de tallo de 1cm y una hoja con una yema axilar sin brotar. Para la incubación se dispusieron en cámaras de crecimiento con luz artificial fluorescente y se sometieron a un régimen de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad y temperatura de 20 ± 2 °C.

Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS para Windows. Se realizaron análisis de varianza de clasificación simple y las medias se compararon a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Evaluación de la fitotoxicidad del propóleo sobre plantas *in vitro* de papa en fase de multiplicación

Para este ensayo se elaboró el medio de cultivo de la fase de multiplicación, compuesto por las sales

del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS), 0.1 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol y 3% de sacarosa.

Se le añadió la formulación al medio de cultivo para lograr concentraciones desde 1ppm a 200ppm de propóleo, en fracciones de diez unidades. Se estableció un tratamiento control del medio de cultivo sin producto y que fue esterilizado por ebullición durante 5 min. Se utilizaron 10 frascos por tratamiento, con 50 ml de los medios de cultivo y 10 explantes en cada uno. Los mismos fueron colocados en la cámara de crecimiento durante 21 días.

Se evaluaron las siguientes variables al concluir esta fase de multiplicación.

- Porcentaje de contaminación microbiana (%)
- Altura del tallo por planta (cm)
- Número de hojas por planta (u)
- Número de entrenudos por planta (u)
- Porcentaje de plantas con clorosis (%)

Efecto del propóleo sobre plantas *in vitro* de papa en fase de multiplicación durante tres subcultivos

Se evaluó el efecto del propóleo sobre plantas *in vitro* de papa durante tres subcultivos de la fase de multiplicación (cada uno de 21 días de duración). Para ello se empleó la concentración no fitotóxica determinada en el ensayo anterior. Además, se incluyó como control el medio de cultivo sometido a ebullición por 5 minutos.

Fueron colocados 10 explantes y se utilizaron cinco frascos por cada uno de los tratamientos. Las plantas se sometieron a condiciones de incubación y las variables evaluadas en cada uno de ellos fueron:

- Porcentaje de contaminación microbiana (%)
- Altura del tallo (cm)
- Número de hojas (u)
- Número de entrenudos (u)
- Porcentaje de plantas con clorosis (%)
- Coeficiente de multiplicación de los explantes (u). (Unidades que se obtienen durante cada subcultivo en la fase de multiplicación a partir de un explante).

Efecto del propóleo sobre las principales características de las plantas *in vitro* en la fase de enraizamiento

Se transfirieron las plantas *in vitro* procedentes de los tratamientos en la fase de multiplicación en medios de cultivo a los cuales se les incrementó la sacarosa (4 %). Se emplearon tratamientos similares al ensayo anterior.

En esta fase las plantas permanecieron 21 días y las variables evaluadas fueron:

- Altura del tallo por planta (cm)
- Número de hojas por planta (u)
- Número de raíces (u)

Estudio del comportamiento en la fase de aclimatación de las plantas *in vitro* procedentes de los medios de cultivo elaborados con propóleo

Se plantaron 200 plantas *in vitro* procedentes de la fase de enraizamiento por cada tratamiento (propóleo a la concentración no fitotóxica y control). Se utilizaron contenedores de polietileno de 247 alvéolos con una capacidad de 32 cm³ por alveolo y un sustrato compuesto por 85% de humus de lombriz y 15% de zeolita. Se realizó fertilización de fondo (NPK 2.5 kg.m⁻³ del fertilizante 10-13-21).

Se efectuó el riego y se mantuvieron las condiciones de cultivo para esta fase según lo señalado por Agramonte (2000).

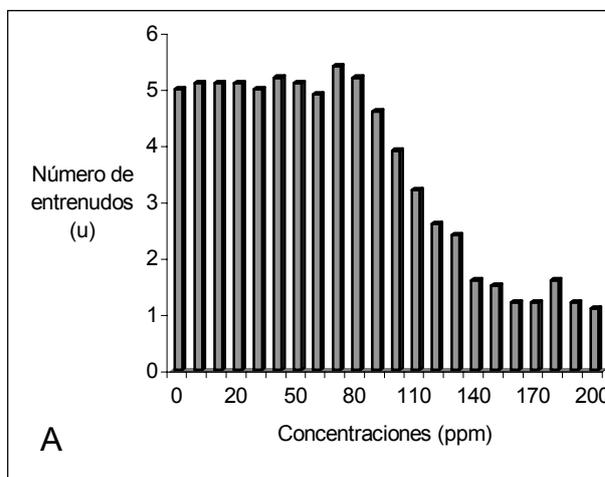
La evaluación se realizó después de transcurridos 15 días y las variables evaluadas fueron:

- Porcentaje de Supervivencia (%)
- Número de hojas (u)
- Altura del tallo (cm)

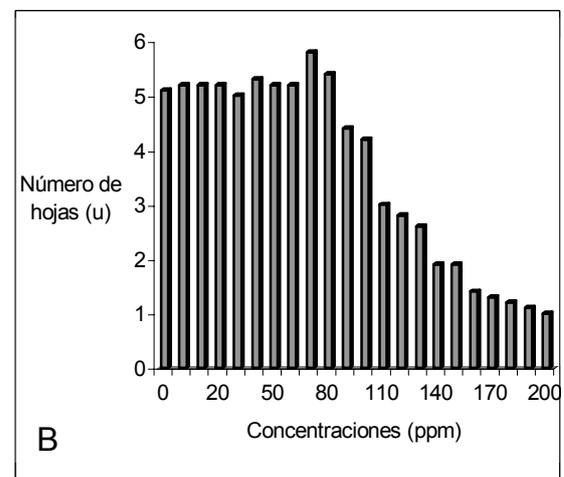
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la fitotoxicidad del propóleo sobre las plantas *in vitro* de papa en medio de cultivo en la fase de multiplicación

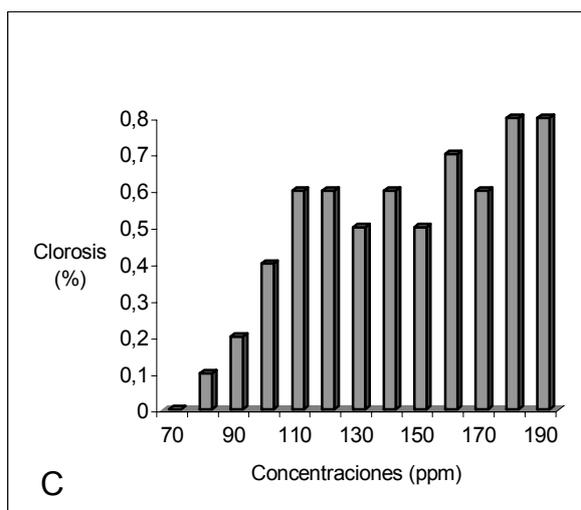
Los estudios de fitotoxicidad permitieron evaluar la relación entre las concentraciones de esta formulación y su influencia sobre las características principales de las plantas *in vitro* en la fase de multiplicación (Figura 1). Los mejores resultados se lograron en la concentración de 70ppm.



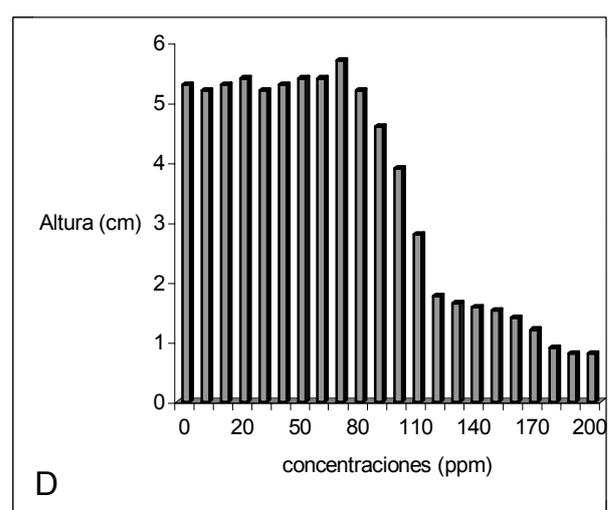
A Error St= 0.7 Coeficiente de variación=18.24



B Error St= 0.58 Coeficiente de variación= 15.40



C Error St= 0.62 Coeficiente de variación= 10.27



D Error St= 0.2 Coeficiente de variación= 14.32

Figura 1. Influencia de las concentraciones de propóleo sobre el número de entrenudos (1A), número de hojas (1B), porcentaje de plantas con clorosis (1C) y altura del tallo (1D) de plantas *in vitro* de papa var Desirée en el medio de cultivo en fase de multiplicación.

En la figura 1 se observa una disminución en las variables a partir de 80 ppm hasta 200 ppm, lo que muestra el efecto fitotóxico de estas concentraciones. Se puede apreciar que a medida que se incrementó la concentración del propóleo, disminuyeron los valores de las características evaluadas de las plantas *in vitro*, hasta niveles en que se detuvo el crecimiento y murieron los explantes.

En las concentraciones inferiores a 80 ppm existió un incremento del crecimiento y desarrollo de las plantas hasta un punto máximo que correspondió con 70 ppm según describe el comportamiento de estas variables en la figura 1. Esta correspondencia permitió señalar a esta concentración como la adecuada para lograr estímulo en el crecimiento de las plantas *in vitro*. Resultados similares se han obtenido con el Vitrofurcul cuando se utilizó para la elaboración de los medios de cultivo a las concentraciones de 35 ppm (Agramonte, 2000).

Diferentes sustancias bioestimuladoras del crecimiento y desarrollo general de las plantas *in vitro* son utilizadas en la micropropagación de plantas; las mismas producen incremento en la tasa de multiplicación de los explantes, la elongación y crecimiento proporcional del tallo, emisión de fuerte sistema radical, etc. (Jiménez *et al.*, 2003). Los diferentes productos estimuladores y reguladores del crecimiento que se utilizan en los medios de cultivo para las plantas *in vitro*, pueden tener efectos fitotóxicos sobre las mismas si se utilizan en concentraciones no adecuadas (Quiñones *et al.*, 2002).

La calidad de los medios de cultivo es un factor importante para lograr el éxito en cualquiera de

las fases de la micropropagación y la misma está relacionada con factores como el pH, el estado físico, la concentración de sustancias químicas y su estabilidad (Orellana, 1994).

Efecto del propóleo sobre la fase de multiplicación *in vitro* de la papa durante tres subcultivos

En la tabla 1 y en las figuras 2 y 3 se observa el comportamiento de cada uno de los tratamientos evaluados durante tres subcultivos.

Existió incremento de las variables altura del tallo, número de hojas, número de entrenudos para la fase de multiplicación. El propóleo tuvo resultados superiores al control para cada una de las variables con diferencias significativas en el número de hojas y el número de entrenudos. El porcentaje de contaminación presentó valores muy bajos, el propóleo fue ligeramente inferior al control (Tabla 1).

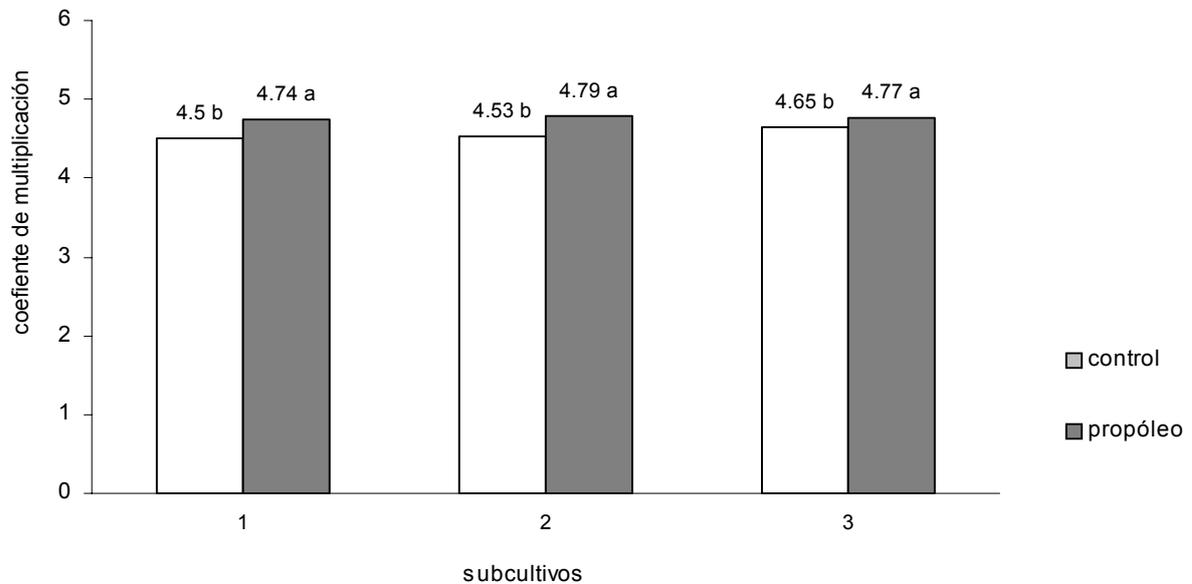
El comportamiento del tratamiento con propóleo en las variables evaluadas evidenció incremento del crecimiento. En la composición química del propóleo se señalan sustancias de origen orgánico que contienen macro y microelementos, favorables para el desarrollo de las plantas (Tolosa y Cañizares, 2002).

Por otra parte, el coeficiente de multiplicación y la altura de las plantas *in vitro* incrementaron sus valores al adicionar al medio de cultivo la formulación de propóleo a una concentración de 70ppm, estas variables mostraron diferencias significativas con el tratamiento control (figuras 2 y 3).

Tabla 1. Efecto del propóleo adicionado al medio de cultivo sobre plantas *in vitro* de papa var Desirée en fase de multiplicación durante tres subcultivos.

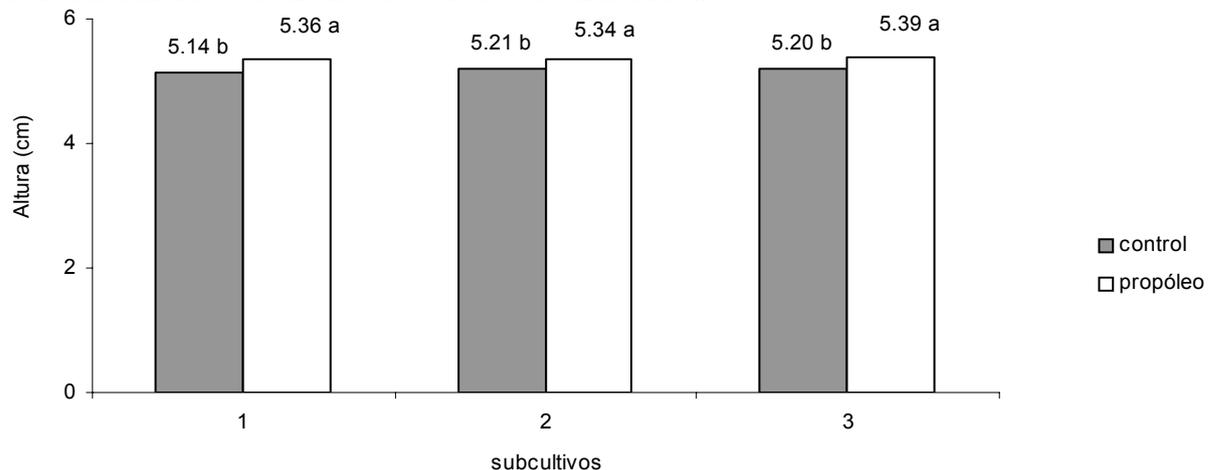
Tratamiento	Subcultivo	Contaminación (%)	Número de hojas (u)	Número de entrenudos (u)
Propóleo		0.2	5.5 a	5.46 a
Control	1	0.4	5.26 b	5.2 b
Error St		0.08	0.19	0.23
Coef Variac. (%)		17.52	12.36	11.82
Propóleo		0.1	5.52 a	5.5 a
Control	2	0.2	5.24 b	5.2 b
Error St		0.27	0.23	0.26
Coef Variac. (%)		15.38	14.59	17.25
Propóleo		0	5.52 a	5.51 a
Control	3	0	5.27 b	5.23 b
Error St.		0.14	0.26	0.22
Coef Variac. (%)		12.74	11.47	14.36

Medias con letras iguales en una columna para un mismo subcultivo no difieren significativamente para $P = 0.5\%$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.



Medias con letras diferentes para un mismo subcultivo difieren significativamente para $P=0.5\%$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan. E.S = 0.03, C.V (%) = 8.42.

Figura 2. Efecto del propóleo en el medio de cultivo (70ppm) sobre el coeficiente de multiplicación de plantas *in vitro* de papa durante tres subcultivos en la fase de multiplicación.



Medias con letras diferentes para un mismo subcultivo difieren significativamente para $P=0.5\%$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan. E.S = 0.05, C.V (%) = 10.29.

Figura 3. Efecto del propóleo en el medio de cultivo (70ppm) sobre la altura de plantas *in vitro* de papa durante tres subcultivos en la fase de multiplicación.

Efecto del medio de cultivo elaborado con propóleo sobre las principales características de las plantas *in vitro* en la fase de enraizamiento

En esta fase de enraizamiento se apreció un comportamiento similar a la fase de multiplicación de las principales características evaluadas. Se muestran en la tabla 2. diferencias significativas en la altura del tallo y el número de hojas del tratamiento propóleo con respecto al control. Estos resultados corroboran el comportamiento del propóleo en la fase anterior.

Comportamiento en la fase de aclimatación de las plantas *in vitro* procedentes de los medios de cultivo elaborados con propóleo

En esta fase se observó un comportamiento similar a las fases anteriores en cuanto a la altura del tallo, y no se observaron diferencias significativas en la supervivencia y el número de hojas (Tabla 3).

El tratamiento con propóleo fue significativamente superior al control en la variable altura del tallo. Las plantas *in vitro* mantuvieron el estímulo del crecimiento de la aplicación del propóleo en el medio de cultivo en las fases anteriores. El empleo de productos químicos, de procedencia natural o sintética está relacionado, entre otros aspectos, con el efecto de las concentraciones de uso sobre el comportamiento de las características morfológicas y fisiológicas de las plantas (Kowalski *et al.*, 1999).

Fondong y Martin (1992) se refirieron al efecto estimulador del crecimiento y desarrollo general de plantas *in vitro* que se logra con empleo ácido giberélico en los medios de cultivo para la micropropagación de la papa y Batea y Panceta (1993) abordaron la utilización de diversas sustancias que promueven el crecimiento y desarrollo de plantas

in vitro de esta misma especie. El análisis químico del propóleo ha arrojado la presencia de componentes inorgánicos y gran variedad de compuestos orgánicos responsables de su acción. Se considera que en las sustancias presentes en el mismo pueden tener efectos biológicos diversos sobre microorganismos, plantas, animales y el hombre (Cuellar, 2002).

Tabla 2. Efecto del propóleo sobre el crecimiento de las plantas *in vitro* de papa var Desirée en la fase de enraizamiento.

Tratamiento	Altura (cm)	Número de raíces (u)	Número de hojas (u)
Propóleo	6.54 a	5.51 a	6.47 a
Control	6.22 b	5.45 a	6.20 b
Error St.	0.31	0.24	0.28
Coefic Variac. (%)	14.56	18.25	10.13

Medias con letras iguales en una columna no difieren significativamente para P= 0.5 % según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tabla 3. Comportamiento en la fase de aclimatización de plantas *in vitro* de papa var Desirée procedentes de medios de cultivo elaborados con propóleo.

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas(u)	Supervivencia (%)
Propóleo	9.66 a	9.94 a	95.9 a
Control	9.47 b	9.82 a	96.2 a
Error St.	0.26	0.17	2.7
Coefic Variac. (%)	11.34	13.59	16.22

Medias con letras iguales en una columna no difieren significativamente para P= 0.5 % según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

CONCLUSIONES

Se comprobó que la formulación de propóleo añadida al medio de cultivo a la concentración de 70ppm tuvo un efecto estimulador del crecimiento de plantas *in vitro* de papa var Desirée en las diferentes fases de la micropropagación.

REFERENCIAS

Agramonte, D (2000) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Desirée. Tesis de Doctorado. IBP. UCLV. Santa Clara

Asis, M (1991) Propóleo. El oro púrpura de las abejas. Centro de información y documentación agropecuaria(CIDA). Ciudad de la Habana. R51

Batea, AK y Pandeta, ML (1993) Effect of plant growth substances and stems cutting on growth, field and multiplication rate in seed potato production 3 national symposium, Modipuram, India. 1-3 Marzo

Cuellar, A (2002) Efectos de los componentes químicos del propóleo cubano III. Revista cubana de Farmacia. 42(2): 14 – 19

Fondong, VN y Martin, C (1992) Effect of GA on the *in vitro* growth and development of four genotypes potato (*Solanum tuberosum* L.) 5-trinrial symposium of the international society for tropical root crops-africa branch. 22-28 Nov. (CIP) Kampala

Jiménez, F Kowalski, B y Agramonte D (2003) Efecto de algunos elicitors sobre indicadores morfológicos y fisiológicos en vitroplantas de *Solanum tuberosum* L. para la producción de semilla. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal. Centro de Bioplantas, Ciego de avila. p. 54. Cuba

Jiménez, F Ramírez, D y Agramonte D (2004) Efecto del Biobras-6 sobre la micropropagación del plátano FHIA-21. Infomusa. Vol.13 No.1: 4-6

Kowalski, B Jaguer AK, Van Staden, J (1999) The effect of a seaweed concentrate on the *in vitro* growth and acclimatization of potato plantlets. Potato Research 42: 131-139

Kowalski, B Jiménez, F Jomarrón, I Agramonte, D y Coll F (2003) Efecto de tres análogos de brasinoesteroides sobre caracteres morfológicos y fisiológicos de vitroplantas de papa c.v. Desirée *in vitro* y en invernadero. Biotecnología Vegetal 3 (2):115-118

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

Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, pp. 40-52. IBP. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara

Quiñones, Y Hernández M, Estévez A, Salomón J, Castillo J, Núñez M y Ortiz E (2002) Efecto de algunos promotores del crecimiento vegetal y el fotoperíodo sobre la tuberización *in vitro* de la papa. XIV Congreso Científico de Ciencias Agrícolas. Noviembre 9 al 12. La Habana, Cuba. p.103

Tolosa, L y Cañizares, E (2002) Evaluation of antimicrobial activity of propolis extracts from Campeche, Mexico. ARS. Pharmaceutical. Faculty of Pharmacy of Granada. 43 (1-2): 187-204

Triana, R (2000) Introducción de una nueva metodología para la esterilización de los medios de cultivo. Tesis para en opción al grado científico de Master en Biotecnología vegetal. IBP. Sta Clara