

Evaluación del efecto del Pectimorf en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de boniato clon CEMSA 78-354

Orlando S. González Paneque^{1*}, Alejandro Falcón Rodríguez², Margarita Hernández Espinosa², Ramón Iglesias Curbelo², Juan J. Silva Pupo¹, Mirtha López Machado², Julio E. Rodríguez Hernández³, Lizardo Arias Gómez³, Juan C. Cabrera² y Edubar Oliva Jaume¹. *Autor para correspondencia.

¹ Universidad de Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Apdo. 21. Bayamo. CP 85 100. Granma. Cuba. e-mail: ogpaneque@udg.co.cu

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Apdo. 1. San José de Las Lajas. La Habana. Cuba.

³ Instituto Nacional de Viandas Tropicales de Camaguey (INIVIT). Camino de Sabanilla al final. Camaguey. Cuba.

RESUMEN

Con la finalidad de estudiar el efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de boniato, fueron recolectadas raíces tuberosas pertenecientes al clon CEMSA 78-354 y se colocaron en frascos con agua en el laboratorio en condiciones semicontroladas para inducir la brotación de las yemas. Posteriormente, se seleccionaron como explantes para la siembra las yemas axilares de los brotes de los tubérculos (establecimiento) y yemas axilares procedentes de plantas *in vitro* (multiplicación), las cuales fueron sembradas en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog que contenía las sales MS, tiamina (1 mg.l⁻¹), mioinositol (100 mg.l⁻¹), sacarosa (3%), gelrite (2 g.l⁻¹), ácido gibérelico (10.0 mg.l⁻¹) y ácido indol-3-acético (0.05 mg.l⁻¹) y este mismo medio de cultivo sin los reguladores del crecimiento antes mencionados, con diferentes concentraciones de Pectimorf: 5.0, 10.0 y 15.0 mg.l⁻¹. Se evaluó el comportamiento morfológico de las plantas *in vitro* a los cinco, quince y treinta días después de establecidas las yemas en condiciones *in vitro* y se analizaron diferentes variables relacionadas con el crecimiento *in vitro* de las yemas: número de yemas brotadas, altura de las plantas *in vitro* (cm), número, longitud y ancho del limbo foliar (cm), número de yemas con raíces, longitud de las raíces (cm) y longitud de los peciolas (cm). Se obtuvieron los mejores resultados al emplear las yemas axilares procedentes de los brotes de raíces tuberosas en comparación con las yemas axilares de las plantas *in vitro* y con el empleo del medio de cultivo que contenía 10.0 mg.l⁻¹ de Pectimorf.

Palabras clave: *Ipomoea batatas*, micropropagación, oligogalacturónidos

ABSTRACT

With the purpose of studying the effect of different Pectimorf dose in the establishment and budding of axillary buds of sweet potato starting from buds, tuberous roots belonging to the clone CEMSA 78-354 were collected and placed in flasks with water in the laboratory under semicontrolled conditions to induce the sprouting of the buds. Later on, axillary buds of the buds of the tubers (establishment) and axillary buds coming from *in vitro* plants (multiplication) were selected as sowing material (explants), which were sowed in the Murashige and Skoog culture medium containing the MS salts, thiamin (1 mg.l⁻¹), myoinositol (100 mg.l⁻¹), sucrose (3%), gelyrite (2 g.l⁻¹), gibberelic acid (10.0 mg.l⁻¹) and indol-3-acetic acid (0.05 mg.l⁻¹) and the already mentioned culture medium without the previously referred regulators of the growth with different Pectimorf concentration: 5.0, 10.0 and 15.0 mg.l⁻¹. The morphological behavior of the *in vitro* plants was evaluated to the five, fifteen and thirty days after established the buds under *in vitro* conditions, and different variables related with the *in vitro* growth of the buds were analyzed, among which we have: number of sprouted buds, height of the *in vitro* plants (cm), number, longitude and width of the leaves, buds with roots, longitude of the roots (cm) and longitude of the petiole (cm). The best results were obtained when using the axillary buds coming from budding of tuberous roots in comparison with the axillary buds of the *in vitro* plants and with the use of the culture medium containing 10.0 mg.l⁻¹ of Pectimorf.

Key works: *Ipomoea batatas*, micropropagation, oligogalacturonides

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones *in vitro* en la especie *Ipomoea batatas*, son de gran importancia y por tal razón, se requiere del desarrollo de programas de investigación en este cultivo (Cantliffe *et al.*, 1993).

El cultivo *in vitro* se puede obtener a partir de pequeños segmentos o explantes de órganos como: raíces, tallos, peciolas, embriones, hojas, yemas, entre otros

(Aldaz, 1999). Un paso de extrema importancia para lograr el éxito en el cultivo *in vitro*, es una adecuada formulación del medio de cultivo de manera que satisfaga los requerimientos nutricionales para el crecimiento óptimo de las células, tejidos y órganos *in vitro* (Chée *et al.*, 1990).

Según Cabrera (2002), el Pectimorf es una mezcla de oligosacarinas bioactivas obtenidas a partir de la pectina cítrica, es un estimulante del crecimiento y

diferenciación celular de diferentes especies vegetales, que presenta un efecto biológico en los medios de cultivo de células vegetales *in vitro* que puede ser de tipo auxínico o citoquinínico en dependencia del balance de reguladores del crecimiento en el medio, pudiendo sustituir parcial o totalmente los reguladores del crecimiento tradicionales en los esquemas de micropropagación de diferentes cultivos.

El boniato, es propagado mayormente por yemas axilares (Austin, 1992). Para lograr este propósito *in vitro* se emplean diferentes reguladores del crecimiento. En este trabajo se pretende evaluar el efecto del Pectimorf en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de boniato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon raíces tuberosas de boniato, procedentes de bancos de semillas y pertenecientes al clon CEMSA 78-354; las cuales se seleccionaron tomando en cuenta su sanidad y uniformidad en el tamaño.

Inducción de la brotación de las yemas y desinfección

Las raíces tuberosas fueron lavadas varias veces con agua y detergente para eliminar las suciedades y se colocaron en frascos de vidrio con agua en condiciones semicontroladas de laboratorio para inducir la brotación de las yemas (temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de 75-80% y luz de 4 000-5 000 lx).

Pasados veinticinco días se procedió al corte de los brotes para la selección de las yemas axilares (explantes), que se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1%) durante 15 minutos y fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril en la cabina de flujo laminar.

También fueron utilizadas yemas axilares procedentes de material vegetal *in vitro* obtenidas según la metodología propuesta por Alguacil *et al.* (1996), que fueron mantenidas en condiciones controladas de laboratorio (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de 80-90% y con luz artificial (16 h luz) con una intensidad de 4 000-5 000 lx).

Evaluación del efecto del Pectimorf en el establecimiento *in vitro*

Las yemas axilares procedentes de ambos casos fueron sembradas en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), con tiamina (1 mg.l^{-1}), mioinositol (100 mg.l^{-1}), sacarosa (3%), gelrite (2 g.l^{-1}) y Pectimorf a diferentes

concentraciones: 5.0, 10.0 y 15.0 mg.l^{-1} . Como control se empleó un medio de cultivo similar con ácido giberélico (10.0 mg.l^{-1}) y ácido indol-3-acético (0.05 mg.l^{-1}).

El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.8 en todos los casos, previo a la adición del agente solidificante. Se utilizó una longitud de las yemas de alrededor de 1 cm, sembradas a razón de una yema por tubo de ensayo de 24.0 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro y se añadieron 10 ml del medio de cultivo por tubo y treinta tubos por tratamiento. En cada caso se realizaron tres repeticiones. El material vegetal sembrado fue colocado en cámaras de cultivo con temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de 80-90% y luz artificial (16 h luz) con una intensidad de 4 000-5 000 lx.

A los cinco, quince y treinta días, se realizaron las siguientes evaluaciones: porcentaje de yemas brotadas, altura de las plantas *in vitro* (cm), número, longitud y ancho de los limbos foliares (cm), porcentaje de yemas con raíces, longitud de las raíces (cm) y longitud de los peciolo (cm). Los resultados fueron evaluados estadísticamente con un diseño completamente al azar y se realizó un análisis de comparación de proporciones a los indicadores: número de yemas brotadas y número de yemas con raíces, se realizó un análisis de varianza simple al resto de los indicadores evaluados; al existir interacciones entre los tratamientos y con la finalidad de evidenciar diferencias entre los mismos, se realizó la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan para el nivel de significación del 1%, contenido el programa en el paquete estadístico TonyStat en MS-DOS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del efecto del Pectimorf en el establecimiento *in vitro*

En las concentraciones de Pectimorf evaluadas, se observaron diferencias cuantitativas y cualitativas en el establecimiento *in vitro* del material vegetal. La obtención de brotes y raíces fue posible en todas las concentraciones evaluadas, alcanzándose valores hasta de un 100% en algunos casos.

El empleo del Pectimorf favoreció la emisión de raíces y estas fueron más abundantes a la concentración de 10.0 mg.l^{-1} , como se observa en la tabla 1. Además, se logró la inducción de brotes y raíces, simultáneamente, en el medio de cultivo (Tabla 1). Las concentraciones de Pectimorf utilizadas incrementaron la longitud de las raíces. Según Mandava (1988), las respuestas de las raíces a las fitohormonas son diversas y fisiológicamente diferentes a las respuestas de los brotes.

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf sobre algunas variables del establecimiento *in vitro* de yemas de boniato clon CEMSA 78-354 obtenidas a partir de tubérculos.

Tiempo (días)	Tratamientos Pectimorf (mg.l ⁻¹)	Yemas brotadas (%)	Altura de las plantas <i>in vitro</i> (cm)	Limbo foliar		Plantas con raíces (%)	Longitud de las raíces (cm)	Longitud de los peciolos (cm)
				Número (n)	Longitud (cm)			
5	Control (AG ₃ 10 mg.l ⁻¹ y AIA 0.05 mg.l ⁻¹)	40.0 c	0.8 d	1.0 c	0.6	0.3	1.0 d	1.1
	5.0	50.0 b	1.6 c	2.1 b	0.8	0.4	3.8 b	1.1
	10.0	70.0 a	3.0 a	3.0 a	1.1	0.6	4.6 a	1.2
	15.0	40.0 c	2.5 b	2.2 b	0.9	0.4	3.1 c	1.3
	E.S	--	2.16	1.47	--	--	2.00	--
15	Control (AG ₃ 10 mg.l ⁻¹ y AIA 0.05 mg.l ⁻¹)	100 a	4.8 d	4.0 c	1.1	0.4	4.5 d	2.1
	5.0	100 a	5.0 c	4.2 b	2.0	1.4	9.8 b	2.1
	10.0	100 a	6.3 a	4.6 a	3.0	2.0	11.4 a	2.1
	15.0	100 a	5.5 b	4.3 b	2.0	1.3	8.1 c	2.5
	E.S	--	2.04	2.04	--	--	1.96	--
30	Control (AG ₃ 10 mg.l ⁻¹ y AIA 0.05 mg.l ⁻¹)	100 a	5.3 d	6.2 d	2.1	1.4	12.1 c	2.6
	5.0	100 a	5.5 c	7.2 c	2.6	1.7	10.6 d	2.8
	10.0	100 a	7.5 a	10.4 a	3.4	2.2	15.6 b	2.8
	15.0	100 a	6.1 b	9.3 b	2.3	1.7	16.5 a	3.4
	E.S	--	2.10	1.66	--	--	2.11	--

Medias con letras comunes para un mismo tiempo de evaluación no difieren significativamente según prueba de rangos múltiples de Duncan $p < 0.01$.

Según Falcón y Cabrera (2002), en los tratamientos que contenían Pectimorf en la inducción de raíces en peciolo de violetas (*Saintpaulia ionantha*), se adelantó en una semana la aparición de raíces en la base del peciolo con relación al control e incluso con relación a los tratamientos en los cuales se aplicaron reguladores del crecimiento. Se observó; además, la duplicación del número de raíces, así como el incremento del largo de las mismas con relación a los resultados alcanzados en el control.

Las condiciones *in vitro* estimularon el desarrollo de las yemas axilares, se favoreció la completa formación de una planta a partir de cada yema. Según Diosdado *et al.* (2003) la actividad biológica de los oligopectatos depende, fundamentalmente, de la concentración utilizada, el grado de polimerización y el balance de reguladores del crecimiento del medio de cultivo.

En lo referente a la longitud del brote se puso de manifiesto que cuando se empleó el Pectimorf a 10.0 mg.l⁻¹, se observaron diferencias estadísticas significativas. Los mayores valores se apreciaron en las yemas obtenidas a partir de brotes de tubérculos colocados en condiciones semicontroladas, en comparación con las yemas axilares procedentes de plantas *in vitro*.

Con respecto a la altura de las plantas *in vitro* obtenidas a partir del establecimiento de las yemas se observó que fue posible el crecimiento de las mismas en todas las concentraciones empleadas. Sin embargo, fue mayor cuando se empleó el Pectimorf en el medio de cultivo a la concentración de 10.0 mg.l⁻¹. Se encontraron diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 1). En los primeros días el Pectimorf ejerció una influencia marcada en el crecimiento de las yemas. González *et al.* (2003), plantearon que el Pectimorf estimula el desarrollo *in vitro* de tejidos y brotes en distintas plantas de interés económico, como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el café (*Coffea arabica*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Las plantas *in vitro* obtenidas mostraron buenas características para ser adaptadas a suelo y proporcionar distintos tipos de explantes para posteriores subcultivos y estudios morfogénicos.

Entre los métodos para lograr la multiplicación de propágulos *in vitro*, la proliferación de yemas axilares posibilita la mayor estabilidad genética en las plantas producidas y puede ser más fácilmente lograda en la mayoría de las especies. Es el método que mayor uso ha alcanzado en los últimos años y ha servido de base para posteriores estudios en la biotecnología (Pérez *et al.*, 1998).

Para el crecimiento de brotes de boniato se han aplicado diferentes concentraciones de reguladores

del crecimiento al medio de cultivo, ejemplo de ello son los trabajos realizados por Cantliffe *et al.* (1993) y Salinas (1994) donde se logró un buen desarrollo de los mismos.

Según Nuñez (2002), el Pectimorf ha sido utilizado con buenos resultados en la inducción de la morfogénesis *in vitro* de varias especies vegetales. Sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos fisiológicos que este producto puede provocar en las plantas.

Al realizar un análisis visual comparativo; se pudo observar que, todos los tratamientos presentaron características morfológicas similares en el vigor con buen crecimiento y desarrollo *in vitro*. Se encontraron diferencias significativas en los indicadores evaluados entre los tratamientos. Las plantas *in vitro* propagadas por yemas axilares a partir de yemas de tubérculos, proporcionaron una mejor calidad de explantes en comparación con las obtenidas a partir de yemas *in vitro*; las cuales pueden emplearse en la multiplicación mediante los subcultivos y en la adaptación a suelo para ser sembradas en condiciones de campo.

Es bueno destacar que, cuando se realiza el cultivo de tejidos, el control de la morfogénesis se efectúa a través de la incorporación exógena de compuestos hormonales y otros elementos nutricionales que permitirán el crecimiento y el desarrollo del material vegetal *in vitro* (Santana, 1993). Los oligogalacturónidos pueden modular el crecimiento y desarrollo de las plantas (González *et al.*, 2002), permitiendo la actividad morfogénica en el cultivo *in vitro*.

Montes *et al.* (2000) afirmaron que uno de los elementos clave y más costosos utilizados en la propagación *in vitro*, lo constituyen los reguladores del crecimiento; por lo que, resulta ventajosa la optimización o sustitución por biorreguladores de mayor eficiencia y menor costo.

Según Plana *et al.* (2003), se han probado los oligogalacturónidos como sustitutos de las auxinas y las citoquininas, para conocer su efectividad en los procesos morfogénicos de diversas especies, los cuales han proporcionado buenos resultados. Trabajos realizados por Reynaldo y Alvarez (2002), demostraron que el empleo del Pectimorf influyó en la velocidad de enraizamiento de semillas de trigo (*Triticum vulgare*).

La capacidad instalada en Cuba para la producción e investigación en la biotecnología de las plantas, donde se utilizan reguladores del crecimiento importados en los diferentes medios de cultivo, le proporcionan a los oligogalacturónidos una oportunidad de introducirse en sustitución total o parcial de los reguladores del crecimiento tradicionales, ya que realizan en algunos casos una función similar y en

otros superior en cantidad y efecto biológico, con la ventaja de que se puede obtener a partir de una materia prima natural y nacional a más bajo precio que las hormonas importadas (Iglesias, 1998; González, 1998).

REFERENCIAS

- Aldaz, JP (1999) Metodología para la propagación del *Anturium cubense* mediante métodos biotecnológicos. Trabajo de Diploma. Universidad Agraria de la Habana. 60 p
- Alguacil, MI, Espinosa A, González O y Silva J (1996) Encapsulado de yemas de boniato: Una alternativa para la obtención de semillas de calidad. Programa y Resúmenes. X Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. p. 72
- Austin, DF (1992) Seeds in some poorly known species of *Ipomoea* section batatas (*Convolvulaceae*). Bulletin of the Torrey Botanical Club 119(2): 142-144
- Cabrera, JC (2002) Desarrollo de activadores de las plantas de amplio espectro de acción. Informe Final de Proyecto. INCA. La Habana. 22 p
- Cantliffe, DJ, Bienick ME y Harrell RC (1993) A Systems Approach to Developing an Automated Synthetic Seed Production Model. Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants pp. 160-196
- Chée, RP, Schultheis JR y Cantliffe DJ (1990) Plant recovery from sweet potato somatic embryos. Hort Science 25(7): 795-797
- Diosdado, E, González S, Cabrera JC (2003) Pectimorf: Nuevo regulador del crecimiento para el cultivo *in vitro* de plantas. IV Taller de Medios de Cultivo y sus Aplicaciones en la Identificación y Propagación de Microorganismos y Células (BioMediCult 2003). Programas y Resúmenes. Centro Nacional de Biopreparado. La Habana. p. 140
- Falcón, A y Cabrera, JC (2002) Actividad auxínica del Pectimorf como inductor del enraizamiento en peciolas de Violeta Africana. Programas y Resúmenes XII Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. p. 107
- González, S (1998) Actividad biológica del Pectimorf en el cultivo *in vitro* de callos y ápices de tabaco. Programas y Resúmenes. Seminario Científico. Taller de Productos Bioactivos y la Agricultura. INCA. Cultivos Tropicales. La Habana.
- González, Y, Reynaldo, I y Utria, E (2002) Influencia del biorregulador Pectimorf en la germinación y el enraizamiento de semillas de soya variedad INCASOY-27. Programas y Resúmenes XII Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. p. 107
- González, E, Diosdado E y Cabrera JC (2003) Posibilidades de los oligosacáridos como sustitutos de hormonas vegetales en los medios de cultivo. Conferencia. IV Taller de Medios de Cultivo y sus Aplicaciones en la Identificación y Propagación de Microorganismos y Células (BioMediCult 2003). Programas y Resúmenes. Centro Nacional de Biopreparado. La Habana.
- Iglesias, R (1998) Informe Final del Proyecto CITMA: Obtención y purificación de oligogalacturónidos bioactivos a partir de la pectina cítrica. Su aplicación en la sustitución de las hormonas vegetales utilizadas en la micropropagación *in vitro* de diferentes especies de plantas. INCA. La Habana.
- Montes, S, Aldaz JP, Cabrera JC y López M (2000) Uso del biorregulador Pectimorf en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. Cultivos Tropicales 2(3): 29-31
- Núñez, M (2002). Influencia de la aplicación de Pectimorf en algunos indicadores del crecimiento de plantas jóvenes de tomate variedad Amalia. Programas y Resúmenes XII Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. p. 106
- Pérez, JN, Jiménez E y Agramonte D (1998) Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Pérez, J.N. (ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, Capítulo 10. pp. 179-191. IBP. Santa Clara.
- Plana, D, Alvarez M, Florido M, Lara R y Cabrera JC (2003) Actividad biológica del Pectimorf en la morfogénesis *in vitro* del Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) var. Amalia. Cultivos Tropicales 24(1): 29-33
- Salinas, R (1994) Evaluación de la actividad biológica de distintos brasinoesteroides. Turrialba 44: 220-226
- Reynaldo, I y Alvarez I (2002). Efecto de los oligogalacturónidos y brasinoesteroides sobre el enraizamiento en trigo tratado con cobre. Programas y Resúmenes XII Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. p. 100