

Evaluación del Pectimorf como regulador del crecimiento en la formación de callos con estructuras embriogénicas en *Ipomoea batatas*

Orlando S. González Paneque^{1*}, Juan José Silva Pupo¹, Margarita Hernández Espinosa², Alejandro Falcón Rodríguez¹, Ramón Iglesias Curbelo², Julio Rodríguez Hernández³, Lizardo Arias Gómez³, Juan Carlos Cabrera², Eubar Oliva Jaume¹. *Autor para correspondencia.

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

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Apdo. 1. San José de las Lajas. La Habana. CP: 32700.Cuba.

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

RESUMEN

Fueron recolectadas raíces tuberosas de boniato pertenecientes al clon INIVIT B 93-1 que se colocaron en frascos con agua en el laboratorio para inducir la brotación de las yemas. Posteriormente, se seleccionaron explantes del limbo foliar (1 cm²) para la formación de callos con estructuras embriogénicas en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog, mio-inositol (100 mg.l⁻¹), tiamina (1 mg.l⁻¹), sacarosa (3%), gelrite (0.2%), 2,4-D (0.50 mg.l⁻¹) y 6-BAP (0.25 mg.l⁻¹) como control y el medio de cultivo anteriormente mencionado con diferentes concentraciones de Pectimorf (5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 mg.l⁻¹). Pasados treinta días se evaluaron el porcentaje de callos formados, desarrollo de los callos, color, textura y presencia de raíces. Los callos se mantuvieron en cámara de incubación en condiciones de oscuridad, temperatura de 25 ± 2°C y humedad relativa del 80-90%. Se obtuvieron buenos resultados en la formación de callos con estructuras embriogénicas al ser utilizado el Pectimorf a la concentración de 15.0 mg.l⁻¹.

Palabras clave: boniato, embriogénesis, oligopectatos

ABSTRACT

Tuberous roots of sweet potato belonging to the clone INIVIT B 93-1, were gathered and placed in flasks with water in the laboratory to induce the emergence of the yolk. Later on, explants of the limbo were selected to foliate (1 cm²) fields in the means of cultivation of Murashige and Skoog, 100 mg.l⁻¹ myo-inositol, 1 mg.l⁻¹ tiamine, 3% sucrose, 0.2% gelrite, 0.50 mg.l⁻¹ 2,4-D and 0.25 mg.l⁻¹ 6-BAP as control treatment and the same medium of above mentioned culture with different pectimorf concentrations (5.0, 10.0, 15.0 and 20.0 mg.l⁻¹) for the formation of callus with embryogenic structures. Thirty days later the percentage of formed callus, their the callus growth, color, texture and presence of roots were evaluated. The callus stayed in incubation camera under conditions of darkness, temperature of 25 ± 2°C and relative humidity of 80-90%. Good results were obtained in the formation of callus with embryogenic structures, when used the pectimorf at 15.0 mg.l⁻¹ concentration.

Key words: embryogenesis, sweet potato, oligopectates

INTRODUCCIÓN

La biotecnología proporciona mecanismos completamente nuevos para el desarrollo de cultivos y el incremento de la calidad y el valor de los ya existentes con la protección del medio ambiente y el establecimiento de cultivos de callos seguido con la formación de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática se ha estudiado en numerosas especies de plantas (Aldaz, 1999).

Los principales componentes del medio de cultivo para el crecimiento ilimitado de células, tejidos y órganos, han sido establecidos en los últimos años gracias a los aportes de numerosas investigaciones. Mediante el medio de cultivo sintético se le proporcionan al

explante los requerimientos nutricionales esenciales en la proporción y concentraciones específicas para cada tipo de tejido cultivado. Un paso de extrema importancia para lograr el éxito 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*.

Existen compuestos químicos sintéticos con actividad fisiológica similar a las fitohormonas endógenas en la modificación del crecimiento y el desarrollo llamados oligopectatos. Los oligopectatos son oligosacarinas consideradas como biorreguladores endógenos en el desarrollo de las plantas y pueden regular la síntesis y acción de las fitohormonas y distintos procesos de

organogénesis y crecimiento (Albersheim *et al.*, 1992). Estudios realizados han demostrado el papel de los oligopectatos como biorregulador del crecimiento y el desarrollo *in vitro* de callos. Estos productos también pueden funcionar en las plantas como señales moleculares que regulan el crecimiento, la diferenciación y la adaptación al ambiente (Cote y Hahn, 1994).

La capacidad del Pectimorf para inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento y la desagregación celular de los callos cuando se desea obtener suspensiones celulares e incrementar de forma notable el desarrollo y vigor de las plantas *in vitro* de diferentes cultivos, validan a este como una alternativa promisoría en la biotecnología vegetal (Bellincampi *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos en el cultivo de tejidos en diferentes especies de plantas, demuestran que este producto no solo puede sustituir parcial o totalmente las fitohormonas tradicionales en la micropropagación de los cultivos; sino que, en la mayoría de los casos se obtienen resultados superiores (González, 1997).

La obtención de plantas *in vitro* de diferentes especies económicas, así como la micropropagación de otras para diversos objetivos, adquiere cada vez más importancia en Cuba y en el mundo. Las posibilidades y ventajas técnicas que ofrece la biotecnología son impredecibles en un futuro próximo para el desarrollo de la agricultura cubana; es por ello que, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del Pectimorf en la formación de callos con estructuras embriogénicas en el cultivo del boniato.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma, ubicado en la provincia del mismo nombre; en colaboración con el Departamento de Fisiología Vegetal y el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de La Habana. De bancos de semillas se recolectaron raíces tuberosas de boniato clon INIVIT B 93-1 las cuales se seleccionaron teniendo en cuenta su sanidad y uniformidad en el tamaño. Posteriormente, se colocaron en frascos de vidrio con agua en condiciones semicontroladas de laboratorio y se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de 75-80% e intensidad luminosa de 4000 – 5000 lux.

A partir de los veinticinco días, se procedió al corte de los brotes y la selección de los explantes de limbos foliares (según González *et al.*, 1998). Estos se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1%) durante 15 minutos. Para evaluar la efectividad en la formación de callos con estructuras embriogénicas, se empleó el medio de cultivo propuesto por

Murashige y Skoog (1962), que contenía mio-inositol (100 mg.l^{-1}), tiamina (1 mg.l^{-1}), sacarosa (3%), gelrite (0.2%), 2,4-D (0.50 mg.l^{-1}) y 6-BAP (0.25 mg.l^{-1}) como medio de cultivo control. Además, en el medio de cultivo basal anteriormente mencionado se utilizó el Pectimorf (5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 mg.l^{-1}), como único regulador del crecimiento. El pH fue ajustado a 5.8 ± 0.01 en todos los casos, previo a la adición del agente solidificante. Se utilizaron cuatro explantes de 1 cm^2 por frasco que contenía 20 ml de medio de cultivo y se emplearon 50 frascos por tratamiento. El cultivo fue colocado en cámaras asépticas a la oscuridad con temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 80-90%.

Transcurridos treinta días se realizaron las siguientes evaluaciones: porcentaje de callos formados, desarrollo de los callos (según escala propuesta por Santana, 1982), color, consistencia y presencia de raíces. Se realizó un análisis de comparación de proporciones contenido en el paquete estadístico COMPAPRO al indicador desarrollo de los callos pertenecientes al grado 3 de la escala.

Descripción de la escala empleada por Santana (1982):

Callos de grado 0: No formación de callos.

Callos de grado 1: Ligera formación del callo (débil proliferación en zonas del borde del explante).

Callos de grado 2: Formación del callo (proliferación celular por los bordes del explante, sin formar una masa).

Callos de grado 3: Abundante formación del callo (masa voluminosa en todo el explante).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se observa que a los veintidós días se obtuvo el mayor porcentaje de callos de grado 3 de la escala en el tratamiento control (80%), de color amarillo crema, nodulares y de fácil disgregación. Con el empleo del Pectimorf en los tratamientos con 10.0 y 15.0 mg.l^{-1} se obtuvieron hasta 100% de callos de grado 2, amarillos, nodulares y de difícil disgregación. Se debe destacar que, hasta este momento los callos obtenidos en el tratamiento control superaban las características morfológicas de los callos del resto de los tratamientos.

A los treinta días después de iniciado el cultivo (Tabla 1), se apreció que en el tratamiento con el empleo del Pectimorf (15.0 mg.l^{-1}) y el control se logró hasta el 100% de callos de grado 3 de la escala, difiriendo estadísticamente con el resto de los tratamientos. Se obtuvieron callos de color crema amarillo, nodulares y de fácil disgregación, lo cual coincidió con lo planteado por Chée *et al.* (1990) en lo referente a las características morfológicas de los callos con estructuras embriogénicas.

Tabla 1. Evaluación del efecto del Pectimorf en la formación de callos con estructuras embriónicas de boniato en el clon INIVIT B 93-1.

Tratamientos (mg.l ⁻¹)	Tiempo (días)																			
	Callos	21				C	Tx	Nd	R	30				C	Tx	Nd	R			
		Desarrollo de los callos*								Desarrollo de los callos*										
%	0	1	2	3	Si	No	%	%	0	1	2	3	Si	No	%					
2,4-D (0.50)	100	0	0	10	80 a	Cr	Fd	*	--	0	100	0	0	0	100 a	Cr	Fd	*	--	0
6-BAP (0.25)						A										A				
Pectimorf (5.0)	100	0	80	20	0 b	B	Dd	*	--	0	100	0	0	100	0 c	Cr	Fd	*	--	0
Pectimorf (10.0)	100	0	0	100	0 b	A	Dd	*	--	0	100	0	0	80	20 b	A	Fd	*	--	0
Pectimorf (15.0)	100	0	0	100	0 b	A	Dd	*	--	0	100	0	0	0	100 a	Cr A	Fd	*	--	0
Pectimorf (20.0)	100	0	100	0	0 b	V	Dd	--	*	40	100	0	0	100	0 c	Cr V	Fd	*	--	80

*Desarrollo de los callos según escala de Santana (1982).

Leyenda: Color (C): Crema (Cr), Amarillo (A), Blanco (B), Verde (V). Textura (Tx): Fácil disgregación (Fd) y Difícil disgregación (Dd), Compacto (Cp). Raíz (R). Nodular (Nd).

Es de destacar que, en el tratamiento con el empleo del Pectimorf (15.0 mg.l⁻¹), se obtuvieron callos de mayor tamaño y con características morfológicas destacables en comparación con el resto de los tratamientos evaluados. Esto hace suponer que el Pectimorf estimuló los procesos de desdiferenciación celular a partir de explantes de limbos foliares y se aceleró este proceso transcurridos varios días después de colocarlos en el medio de cultivo en condiciones asépticas.

Con el empleo del Pectimorf a la concentración más alta evaluada (20.0 mg.l⁻¹) se observó a partir de los veintiún días la presencia de raíces, las cuales fueron de color verde y no superaron los 3 cm de longitud, proceso este que se incrementó al mantener el cultivo en las mismas condiciones. A los treinta días se observó un aumento en el número y longitud de las raíces a la concentración antes mencionada; lo cual demostró que, el Pectimorf tiene un efecto estimulante en los procesos de rizogénesis cuando es empleado a esta concentración.

Según Montes *et al.* (2000), en la propagación *in vitro* de *Anthurium cubense* con la adición de Pectimorf al medio de cultivo, se observaron efectos favorables ya que obtuvieron un buen crecimiento y desarrollo en los tratamientos en estudio en lo referente a la regeneración de brotes a partir de callos.

De igual forma, en trabajos realizados por Plana *et al.* (2003), con el empleo de Pectimorf en la morfogénesis *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), se alcanzó el mayor porcentaje de callos en los tratamientos con 10.0 y 15.0 mg.l⁻¹, donde el primero aportó mayores resultados.

En el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, el control de la morfogénesis se efectúa a través de la incorporación exógena de compuestos hormonales y otros elementos nutricionales al medio de cultivo (Santana, 1993). Es ampliamente reconocido por muchos autores el papel determinante que juegan los reguladores del crecimiento en la respuesta *in vitro* de diferentes tipos de explantes, así como la influencia del genotipo y las condiciones de incubación; por lo que se hace necesario determinar el medio de cultivo para cada variedad y tipo de explante (González, 2000).

La inhibición de la rizogénesis inducida por las auxinas o por los oligopeptatos puede ser contrarrestada incrementando la concentración de auxinas en el medio. Algunos de los efectos de los oligopeptatos apoyan la hipótesis del efecto antiauxínico de los mismos. Sin embargo, existen otros efectos donde el decrecimiento en la concentración de auxinas no se asemeja al efecto de adicionar y cuando se adicionan los oligopeptatos no se obtiene una respuesta semejante al caso en que se disminuyen y este resultado es la primera evidencia de que pueden controlar la organogénesis vegetal (Cabrera, 1999).

El efecto de los oligopeptatos en la formación de órganos en las plantas es el más sensible planteado hasta la fecha. Estos hallazgos han abierto el camino para el descubrimiento de nuevos fragmentos pépticos con actividad reguladora en callos, embriones somáticos y suspensiones celulares (Benítez, 1998). Según Diosdado *et al.* (2003), la actividad biológica de los oligopeptatos depende de

la concentración utilizada, el grado de polimerización y el balance fitohormonal del medio de cultivo.

Cabrera (1999), planteó que los oligopectatos tienen un efecto marcado en la morfogénesis de plantas; es por ello que, la ampliación de estos resultados a otras especies (raíces y tubérculos, plantas ornamentales, flores, piña y otros) es también de interés económico y permitirá alcanzar un alto e importante peldaño en el conocimiento más completo del Pectimorf en su efecto biotecnológico integral.

CONCLUSIONES

Se comprobó que es posible emplear Pectimorf para la formación de callos con estructuras embriogénicas en boniato (*I. batata*) clon INIVIT B 93-1.

La introducción de los oligopectatos en las tecnologías de micropropagación constituye una alternativa promisoría para mejorar la eficiencia económica del proceso con insumos nacionales y obtener plantas *in vitro* con un buen desarrollo vegetativo.

AGRADECIMIENTOS

A los investigadores del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de la Habana (INCA), con énfasis en la dirección del Centro y a los miembros de Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, en especial al Ms. C. Juan Castillo Hernández y Pedro Brito Gaspar y el Departamento de Fisiología Vegetal, que hicieron posible la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

Albersheim, P, Darvill AG, Augur C, Cheong JJ, Eberhard S, Hahn HG, Marfá V, Mohnen D, O'Neill MA, Spiro MD y York WS (1992) Oligosaccharins: Oligosaccharides regulatory molecules. Acc. Chem. Res. 25: 77-83

Aldaz, JP (1999) Metodología para la propagación del *Anthurium cubense* mediante métodos biotecnológicos. Trabajo de Diploma. Universidad Agraria de la Habana. 60 p

Bellincampi, D, Cervone F, Altamura M, Constantino P, Lorenzo G, Cardarelli M, Zaghi D, Serino G, Salvi G y Gatz C (1996)

Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in roll B - transformed tobacco explants by inhibiting auxin induced expression of the roll B gene. Plant Cell 8: 477-487

Benitez, AL (1998) Actividad biológica del pectimorf sobre el desarrollo de callos de *Saccharum officinarum* L. de la variedad C-8751. Tesis de Grado Facultad de Biología, Universidad de la Habana. 70 p

Cabrera JC (1999) Actividad biológica de las oligosacarinas de origen péptico. Experiencia cubana y posibilidades biotecnológicas. Folleto. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana. 17 p

Cote, F, Hahn M (1994) Oligosaccharins. Structure and signal tradition. Plant Molecular Biology 26: 137-144

Chée, P, Schultheis J, 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

González, S (1997) Efecto del Oligopectato DP>12 en callos de *Saccharum officinarum*, L. Revista Biología. Universidad de La Habana.

González, OP, Silva JJ, Espinosa A y Santana N (1998) Selección del explante para la formación de callos de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Centro Agrícola 2: 51-56

González, MC (2000) Efectos de diferentes reguladores del crecimiento sobre el comportamiento *in vitro* de la variedad de arroz AMISTAD-82. Comunicación corta. Cultivos Tropicales 21 (1): 27-28

Montes, S, Aldaz JP, Cevallos M, Cabrera JC, López M (2000) Uso del biorregulador pectimorf en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. Cultivos Tropicales 21 (3): 29-31

Plana, D, Álvarez M, Florido M, Lara R, 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

Santana, BN (1982) Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum species*) *in vitro*. Cultivos Tropicales 4 (3): 48-54

Santana, N (1993) Embriogénesis somática en el cultivo del caféto (*Coffea sp.*). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 155 p