

Multiplicación y conservación in vitro de genotipos autóctonos de la biodiversidad agrícola.

Multiplication and in vitro conservation of native genotypes of agricultural biodiversity.

Autores: Lic. Norbelis Abreu-Romero, Ing. Alieski Meriño-Mayné, Lic. Esmérida Sánchez-Márquez.

Organismo: Centro de Desarrollo de la Montaña. El Salvador, Guantánamo, Cuba.

E-mail: aliesky@cdm.gtmo.inf.cu.

Teléfonos: 21 28 21 20, 21 28 22 07

Resumen.

El trabajo fue desarrollado en el período comprendido entre enero de 2017 a enero de 2018 en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Desarrollo de la Montaña, con el principal objetivo de conservar genotípicamente especies de plantas que se encuentran en peligro de extinción o son de difícil accesibilidad por parte de los agricultores en los diferentes agroecosistemas montañosos del macizo Nipe-Sagua-Baracoa. Los principales resultados obtenidos durante el desarrollo de la actividad residieron en la conservación in vitro de 613 esquejes de ñame guinea, 576 esquejes de filipinos en pomos en fase de multiplicación, la iniciación de 38 esquejes de ñame amarillo y de 51 esquejes del clon filipino. Por otro lado fueron evaluados los parámetros morfológicos y número de hijos en vitroplantas de plátano fruta (Gran enano), adaptadas a condiciones de campo y sometidas a la aplicación de microorganismos eficientes.

Palabras clave: conservación, genotipos, biodiversidad.

Abstract.

The work was developed from January 2017 to January 2018 in the Laboratory of Vegetal Biotechnology of the Mountain Development Center, with the main objective of genotypically conserving species of plants which are either at risk of extinction or of difficult access by farmers in the different mountain agroecosystems of the Nipe-Sagua-Baracoa massif. The main results obtained during the development of the activity were based on the in vitro conservation of 613 cuttings of guinea yam, 576 Philippine cuttings in knobs in multiplication stage, the beginning of 38 cuttings of yellow yam and 51 cuttings of the Philippine clone. On the other hand, morphological parameters and number of children were evaluated in plantain fruit vitroplantas (Gran enano), adapted to field conditions and under the application of efficient microorganisms.

Keywords: conservation, genotypes, biodiversity.

Introducción.

La conservación de germoplasma vegetal como actividad científica fue propuesta en los años 70 del siglo XX, con el objetivo de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad agrícola de muchas especies a partir de la conservación de diferentes especies y genes de interés. Existen dos estrategias básicas para la conservación de germoplasma vegetal, la conservación in situ y la conservación ex situ (Murashige y Skoog, 2016).

La conservación de la biodiversidad es un tema que ha venido ganando relevancia de forma progresiva en nuestra sociedad. No sólo se trata de la obligación ética de preservar este legado que se nos ha dado para las generaciones venideras o del puro interés científico que puede aportar. La sociedad es cada vez más consciente de la importancia de la conservación de organismos biológicos de calidad para asegurar la riqueza de especies en el futuro (Rayaset *al.*, 2017).

La conservación toma especial relevancia en nuestros días dado el acelerado proceso de degradación ambiental en el que vivimos. Sin embargo, la preocupación por la conservación de los recursos vegetales es tan antigua como la propia civilización humana. Es por ello que el equipo de la tarea ha desarrollado diferentes acciones para conservar material genético autóctono de la biodiversidad.

Materiales y métodos.

Colecta y prospección de semillas de malanga y ñame.

Se realizó la colecta y prospección de viandas (malanga y ñame) en diferentes agroecosistemas cafetaleros de la CCS “Luis A. Carbó” del municipio El Salvador y la CCSF “José Antonio Sánchez Marzo” del municipio Maisí. A partir de las colectas realizadas se acondicionó el sistema de grelado en condiciones de casa de vegetación, con el propósito de que sirviera la emisión de yemas para la multiplicación de los diferentes materiales génicos in vitro.

Por otro lado se desarrollaron actividades de investigación de la CCS “Sabino Pupo”, ubicada en la comunidad de Guayacán en el municipio El Salvador, donde fue diseñado un experimento con el fin de evaluar diferentes dosis de microorganismos eficientes en el desarrollo vegetativo de vitroplantas de plátano fruta.

Se señala que fueron introducidas un total de de 86 vitroplantas en la finca del agricultor Fructuoso Moreira, asociado a la cooperativa antes mencionada, en un área que incluye 0, 2ha con una pendiente de terreno que oscila en el 4 % con presencia de suelos pardos oscuros.

Las vitroplantas de plátano fruta proceden de la Biofábrica de la Empresa Agroforestal “Cor. Arturo Lince González”, como parte del trabajo investigativo con otras instituciones participantes en el proyecto.

Experimento 1. Evaluación de parámetros morfológicos y productivos a vitroplantas de plátano fruta introducidas en campo.

Para el desarrollo del experimento se tuvieron en cuenta los indicadores que guardan relación con los rendimientos y el desarrollo de cultivo, como respuestas en condiciones climáticas de la comunidad de Guayacán.

Parámetros evaluados.

1. Altura de la planta: para el desarrollo de la evaluación de este parámetro fue necesario utilizar una regla de 2 metros.

2. Diámetro del tallo: para el diámetro del tallo se utilizó una cinta métrica.
3. Emisión de hijos: los investigadores se apoyaron en el conteo visual.
4. Racimos por plantas: ídem.

De un total de 86 vitroplantas establecidas en campo, solamente fueron sometidas a procesos evaluativos 10 plantas de cada carrera.

Aplicación de diferentes dosis de Microorganismos Eficientes (EM).

En la tabla 1 se muestra el diseño del experimento desarrollado en vitroplantas de plátano establecidas e introducidas en fincas de productores, por lo que las aplicaciones fueron cada 30 (EM). Para todos los tratamientos, las diferentes dosis del producto fueron aplicadas al cultivo en el follaje.

Tratamientos	Dosis aplicadas
Testigo	Sin aplicación
Tratamiento # 1	2 % de producto (EM) (400 ml/Mochila 16 Lts)
Tratamiento # 2	4 % de producto (EM) (800 ml/Mochila 16 Lts)

Tabla 1: Diseño experimental en vitroplantas de plátano fruta (Gran enano)

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico Statgraphisc versión 5.1. Los clones de ñame (*Dioscoreaspp.*) colectados fueron: guinea, filipino y amarillo; los de malanga (*Xanthosomasagittifolium*) fueron: morada y blanca.

Procedimientos desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Las actividades se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM), localizado en el municipio El Salvador, aproximadamente a 450 metros sobre el nivel del mar, en el macizo Montañoso Nipe-Sagua-Baracoa, en el período comprendido de enero de 2017 a enero de 2018.

Malanga. Procedimientos generales.

Se emplearon cormos de plantas élites de malanga, tomadas del banco de semillas del CDM. Las plantas seleccionadas mostraron buen crecimiento, vigor y estado fitosanitario y fisiológico. Una vez seleccionados estos materiales (cormos y cormelos) en buen estado fueron depositados en sistema de gelado con condiciones favorables para la emisión de yemas en las casas de vegetación.

Fase preparatoria.

Los geladores ubicados en las casas de vegetación están contruidos con paredes de mampostería y contienen arena de río lavada. Su desinfección consistió en la desinfección con formol al 5% de concentración durante 72 horas, posteriormente el lavado con abundante agua y el drenaje por tiempo de 24 horas.

La desinfección del material vegetal se realizó mediante pre-tratamientos con el fungicida Mancozed ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y el antibiótico Tetraciclina ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

El riego a los geladores se realizó una vez a la semana, durante un mes. Estos riegos garantizaron la humedad necesaria, sin que ocurrieran encharcamientos.

Ñame. Procedimientos generales.

Se emplearon tubérculos provenientes de agroecosistemas cafetaleros de los municipios El Salvador y Maisí, en la provincia de Guantánamo. Los tubérculos se desinfectaron con el fungicida Mancozed ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y el antibiótico Tetraciclina ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); estos materiales al igual que los cormos de malanga fueron depositados en condiciones de gelado en casas de vegetación. Es necesario precisar que al sustrato gelado se le aplicó una concentración de

formol al 5% durante 72 horas. Posteriormente, se lavó con abundante agua y se dejó drenar por tiempo de 24 horas.

Después de iniciado el proceso de brotación de las yemas se aplicó nuevamente un tratamiento a base de Mancozed (50mg.L⁻¹) y Tetraciclina (100mg.L⁻¹). Cuando los brotes alcanzaron entre 40 y 60cm de longitud se utilizaron las puntas y prepuntas para la fase de establecimiento in vitro, específicamente para los clones de ñame.

Fase de establecimiento o iniciación.

Las guías vegetativas seleccionadas (3cm) se llevaron al laboratorio y en el área semi-aséptica se sometieron a desinfección: detergente al 1% durante 5 minutos; posteriormente se realizaron varios enjuagues con agua destilada y, por último, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5% con dos gotas Tween 80 (agente humectante) durante 20 minutos.

El proceso de desinfección del material vegetativo continuó en el área aséptica y bajo condiciones de flujo laminar, sumergiendo el material primeramente en etanol al 70% durante un minuto y posteriormente en tetraciclina (100mg.L⁻¹) por 10 minutos. A continuación, se realizó el enjuague con agua destilada y esterilizada por métodos químicos (solución lugol) a razón de 1ml.L⁻¹ y por último fueron sumergidos en una solución de ácido giberélico a una concentración de 0.1mg.L⁻¹ durante 5 minutos.

En el flujo laminar y con la ayuda de pinza, bisturí y placas de Petri se cortaron secciones de aproximadamente 1cm de longitud del material desinfectado, las que se introdujeron en tubos de ensayos de 150 x 25mm que contenían medio de cultivo Murashigey Skoog (2016), suplementado con 1mg.L⁻¹ de tiamina, 30g.L⁻¹ de sacarosa, 1mg.L⁻¹ de 6-bencilaminocurina (6 BAP), 0.01mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 6g.L⁻¹ de agar. El pH se ajustó a 5.7.

Por último, se realizó la incubación de los materiales de multiplicación a 26 grados Celsius de temperatura, 3000 lux de intensidad luminosa, 80% de humedad relativa y 16 horas de fotoperíodo.

Acciones desarrolladas en casas de vegetación.

1. Acondicionamiento de la casa de cultivo para la aclimatación de plantas in vitro.
 - Preparación y desinfección de los greladores (arena de río lavada).
 - Preparación de medios de cultivo para la iniciación in vitro de malanga y ñame.
 - Selección de cormos de malanga y tubérculos en sus primeros estadios de ñame procedentes de semillas obtenidas con anterioridad en el laboratorio.
 - Aplicación de tratamientos sistémicos para la desinfección de los materiales de siembra con antibiótico (Tetraciclina) y fungicida (Mancozed).

Materiales de apoyo a la investigación.

- El cultivo de la malanga (*Colocasia esculenta*): Tecnología para su producción. 2001.
- Metodología para la propagación in vitro del ñame (*Dioscorea alata*). 1997.
- Metodología para la propagación in vitro del plátano (*Musa ssp*). 1997.

Resultados y discusión.

La micropropagación es una técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación práctica. Es una técnica relativamente simple que garantiza alta estabilidad genética y consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos con fracciones de tejidos u órganos en un medio de cultivo artificial (Murashige y Skoog, 2016). La producción de plantas cultivadas in vitro ha alcanzado un gran auge en

el mundo y es empleada por muchos países en sus programas nacionales para la producción de semillas. La micro propagación consta de cuatro fases fundamentales: preparatoria (fase 0), iniciación o establecimiento (fase 1), multiplicación (fase 2), enraizamiento o pre-trasplante (fase 3) y adaptación a las condiciones ambientales (fase 4), (García *et al.*, 2017).

En las tablas 2, 3 y 4 se muestran las yemas de ñame obtenidas y conservadas en los diferentes clones.

Los explantes no contaminados a las cuatro semanas se llevaron a la próxima fase (crecimiento o multiplicación). Estos explantes fueron inoculados en frascos de cultivo de 250ml de capacidad que contenían el medio de cultivo suplementado con 1mg.L⁻¹ de tiamina, 20mg.L⁻¹ de cisteína como agente antioxidante, 30g.L⁻¹ de sacarosa y 6g.L⁻¹ de agar. El pH se ajustó a 5.7.

Número de iniciación	Cantidad de yemas iniciadas	Cantidad de yemas no contaminadas	% de contaminación
I	88	75	14.7
II	105	84	20
III	144	108	25
IV	104	85	18.2

Tabla 2. Yemas de ñame guinea conservados a través del cultivo de tejidos vegetales.

En la tabla 3 se muestra el número de vitroplantas de ñame guinea obtenidas y conservadas en las tres fases.

Pases	Cantidad de vitroplantas obtenidas de ñame guinea
I	230
II	266
III	167
Total:	613

Tabla 3. Total de vitroplantas obtenidas y conservadas de ñame clon guinea.

La tabla 4 muestra los diferentes clones de ñame filipino y amarillo obtenidos y conservados durante la investigación.

Vitroplantas obtenidas y conservadas durante la investigación		
Pase	Clon filipino	Clon amarillo
IV	576	81

Tabla 4. Vitroplantas obtenidas y conservadas de los clones de ñame filipino y amarillo.

Por otro lado y para el cultivo de la malanga (*Xanthosoma* y *Colocasia*) fue dificultoso obtener cormos y cormelos de material élite para su reproducción a través del cultivo de tejidos, ya que solo se procedió a la prospección y colecta de semillas en los diferentes agroecosistemas cafetaleros que integran los municipios de Yateras, El Salvador y Maisí, por lo que fueron establecidos los centros de reproducción acelerada de semillas en casas de vegetación, lo que permitió crear las condiciones para el establecimiento in vitro de los germoplasmas.

Experimento 1. Evaluación de parámetros morfológicos y productivos a vitroplantas de plátano fruta introducidas en campo.

En el período que se evalúa fueron sometidas a la aplicación de dosis de microorganismos eficientes un total 30 plantas de plátano fruta de 86 vitroplantas ya adaptadas a las condiciones particulares de Guayacán, donde se tuvieron en cuenta diferentes parámetros relacionados con el crecimiento y la producción, aspectos que se detallarán a continuación.

Tratamientos	Altura	Diámetros del tallo	Emisión de hijos
I. Testigo	17.5 c	2.24 a	2.4 b
II. 2 % (EM)	27.8 b	2.43 a	3.9 a
III. 4 % (EM)	32.4 a	2.28 a	2.7 b
D.S	7.57	0.25	1.1

Tabla 5: Resultados de la aplicación de diferentes dosis de microorganismos eficientes a plantas de plátano fruta.

Media seguida de letras desiguales en la columna difieren significativamente de $P \leq 0,05$.

Se puede observar que la respuesta de la altura de las plantas frente a la aplicación de la dosis al 4% mostró diferencias en cuanto a los demás tratamientos; esto pudo estar influenciado por el rápido crecimiento de las plantas una vez aplicado el producto cada 15 días al suelo y cada 30 días al follaje.

Este desarrollo ha sido posible por el manejo facilitado relacionado con la aplicación de materia orgánica proveniente de estiércol animal (bovino), lo que incrementa el desarrollo vegetativo según investigaciones realizadas.

Cuando se analizó el diámetro del tallo en el experimento se pudo constatar que en este no existió variantes, es decir, diferencias significativas en el parámetro evaluado. Según el paquete estadístico existió un desarrollo normal de todas las plantas.

Uno de los aspectos más importantes que asegura la plantación de nuevas áreas con el cultivo está relacionado con la emisión de hijos por plantas, el cual mostró diferencias de mayor número de hijos por plantas para el caso del tratamiento II; esto indica la capacidad que tienen las plantas dependiendo de su manejo de auto alimentarse y emitir descendientes con características semejantes, lo que está aparejado a la rápida respuesta de las plantas frente a la aplicación de esta dosis.

Por otra parte, según la producción de racimos por plantas, se pudo constatar que de 86 vitroplantas establecidas e introducidas solamente 9 plantas se encuentran en producción, con un rango que va de 7 a 9 manos con la presencia de 5 a 8 dedos/manos.

Mansilla (2015) reportó que la aplicación de los microorganismos eficientes en el cultivo del plátano actúa no solo en el incremento del follaje y la emisión de hijos sino también en la descomposición del material orgánico existente en los suelos.

Conclusiones.

Se conservó material genético de clones de viandas (ñame, malanga).

Se incrementó la existencia de semillas en los cultivos de ñame, malanga.

Se estableció un área de grelado para el ñame y la malanga.

Se logró el rejuvenecimiento fisiológico de clones autóctonos de ñame (filipino y guinea).

Establecimiento de desinfección sistémica para ñame, malanga y plátano fruta.

Referencias bibliográficas.

Mansilla, M. (2015). Uso de Microorganismos eficientes en el cultivo Plátano.

García, L., de Feria, M., Acosta, K. (2017). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal.

Murashige, T., Skoog, F. (2016). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.

Rayas, A., Cabrera, M., Gutiérrez, V., García, M., López, J., Rodríguez, S. (2017). Efecto del manitol sobre la conservación in vitro de germoplasma de *Dioscorea alata*. XI Encuentro de Botánica “Johannes Bisse In Memoriam”.

Fecha de recibido: 28 agosto 2018

Fecha de aprobado: 1 nov. 2018