

# **ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DE UNA FORMULACIÓN DE PROPÓLEOS SOBRE EL PROCESO BIOTECNOLÓGICO DE MICROPROPAGACIÓN DE PAPA ( *SOLANUM TUBEROSUM* L. )**

*Autores MSc. Edisleidy Águila Jiménez<sup>1\*</sup>, MSc. Felipe Alberto Jiménez Terry<sup>2</sup>, Lic. Yaniet Reyes Vergara<sup>3</sup>, Dr. Daniel Agramonte Peñalver<sup>2</sup>, Dr. Raúl Barbón Rodríguez<sup>2</sup>, MSc. Raúl Collado López<sup>2</sup>, Martha Pérez Peralta<sup>2</sup>, Odalis Gutiérrez Martínez<sup>2</sup>, MSc. Rafael Sosa Martínez<sup>1</sup>, Dr. Remigio Cortés Rodríguez<sup>1</sup>.*

*\*Autor para correspondencia.*

*1 Centro de Bioactivos Químicos*

*2 Instituto de Biotecnología de las Plantas*

*3 Universidad Central de las Villas*

## **Introducción**

El auge y desarrollo de la biotecnología vegetal en las últimas décadas no ha estado exento de dificultades tecnológicas. La contaminación por microorganismos constituye hoy en día uno de los principales y más severos problemas para los micropropagadores en el mundo. Este fenómeno es multicasual.

Los microorganismos pueden causar daños a las plantas directa o indirectamente y provocan cuantiosas pérdidas de material vegetal en los procesos productivos o de investigación.

En la lucha por prevenir o eliminar la contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas se han ensayado y puesto en práctica diferentes alternativas que van desde el incremento de las medidas de asepsia, tratamiento de las plantas donantes, etc., hasta el subcultivo de las plántulas en medios de cultivos con productos antimicrobianos de origen sintético o natural.

En nuestro trabajo nos referiremos a un producto de origen natural: el propóleo, compuesto heterogéneo formado por más de 273 componentes la mayoría de los cuales se encuentran fundamentalmente en las plantas, específicamente en las resinas de las mismas. Dentro de estos componentes se encuentran: flavonoides, coumarinas, terpenoides, compuestos fenólicos y taninos, algunos de los cuales presentan propiedades antimicrobianas ya probadas. 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 propóleos

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 oC, 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  $20 \pm 2$  °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.

#### 1. Evaluación de la fitotoxicidad del propóleos 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 entrenudos por planta (u)
- Porcentaje de plantas con clorosis (%)

## 2. Efecto del propóleos 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).

## 3. Efecto del propóleos 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)

## 4. Estudio del comportamiento en la fase de aclimatización de las plantas *in Vitro* procedentes de los medios de cultivo elaborados con propóleos

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 polietirano de 247 alvéolos con una capacidad de 32 cm<sup>3</sup> 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<sup>-3</sup> 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:

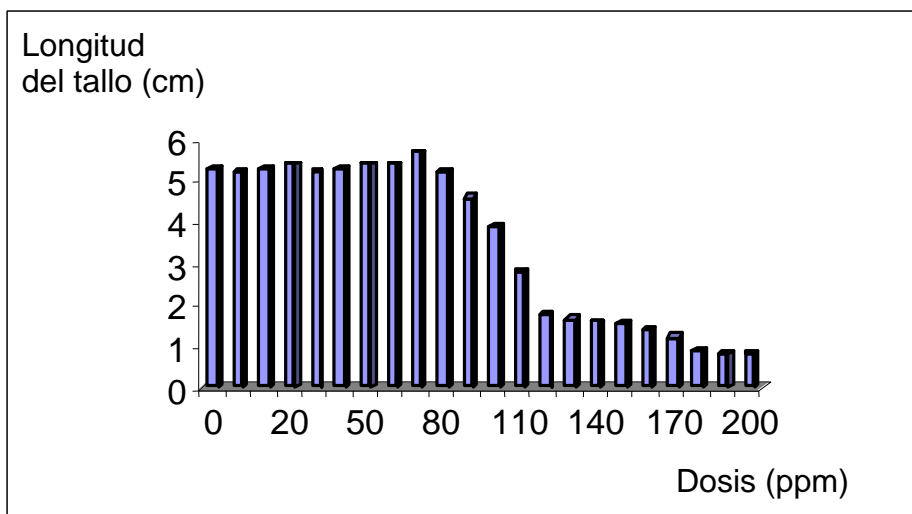
- Porcentaje de Supervivencia (%)
- Número de hojas (u)
- Altura del tallo (cm)

## Resultados y discusión

1. 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). En esta figura se muestra la influencia de las concentraciones de propóleos sobre la longitud del tallo de plantas de papa cultivadas in vitro de la variedad descrees en la fase de multiplicación.

Los mejores resultados se lograron en la concentración de 70ppm.



En el gráfico 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 Vitrofurax 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 (Quiñónez 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).

## 2. Efecto del propóleo sobre la fase de multiplicación in vitro de la papa durante tres subcultivos

En la tabla 1 se observa el comportamiento de cada uno de los tratamientos evaluados durante los 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).

Tabla 1. Efecto del propóleo adicionado al medio de cultivo sobre plantas in vitro de papa 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.  $E.S = 0.03$ ,  $C.V (\%) = 8.42$

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).

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

### 3. 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.

Tabla 2. Efecto del propóleos sobre el crecimiento de las plantas in vitro de papa 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.

#### 4. Comportamiento en la fase de aclimatización de las plantas in Vitro procedentes de los medios de cultivo elaborados con propóleos

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 propóleos fue significativamente superior al control en la variable altura del tallo. Las plantas in Vitro mantuvieron el estímulo del crecimiento de la aplicación del propóleos 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).

Tabla 3. Comportamiento en la fase de aclimatización de plantas in Vitro de papa procedentes de medios de cultivo elaborados con propóleos.

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas(u)	Supervivencia (%)
Propóleos	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.

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).

## Conclusiones

- La dosis adecuada de trabajo con el producto formulado con propóleos fue de 70 ppm. Se observó una marcada fitotoxicidad a dosis superiores a este valor.
- Existe un comportamiento superior al testigo de los tratamientos con Vitrofur y formulado de propóleos desde la fase de multiplicación *in Vitro* hasta la de aclimatización.

## Bibliografía

1. Pérez, J. N. (1987). Instructivo técnico para la micropropagación in vitro de clones de *usa spp.* Ediciones Internas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba. pp. 3 – 9.
2. Sauvaire, D. y Galsy, P. (1983). Micropropagation de la canne a sucre par bouturage in vitro. Action d' une auxine cytokinine. Paris, France.
3. Suárez, M. (2000). Presupuesto de gasto para Biofábricas. Manuscrito. Informe Final de Investigación. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba.
4. Pérez, J. N. et al (1998). Propagación masiva en biofábricas.(Capítulo 14).En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas.Santa Clara, Cuba..
5. Agramonte,D.(1998). Aclimatización.(Capítulo 11). En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editado por IBP. UCLV. Santa Clara, Cuba. pp. 193-202.
6. Jiménez,F.A. :Tesis para optar por el grado científico de Máster en Biotecnología Vegetal.1998-2000. Aclimatización de plantas in vitro y producción de minitubérculos de papa(*Solanum tuberosum L.*), en casas de cultivo.