

Original

Efecto del tipo de explante y la desinfección en el establecimiento *in vitro* de Morera variedad criolla

Effect of explant type and disinfection in the establishment *in vitro* of Mulberry criolla variety

Dr.C. Jorge Liusvert Pérez Pérez, Profesor Titular, Universidad de Granma, Cuba,

jperez@udg.co.cu

Ing. Marisel Bahi Arevich, Profesor Instructor, Universidad de Granma, Cuba,

mbahia@udg.co.cu

Dr.C. Juan José Silva Pupo, Profesor Titular, Universidad de Granma, Cuba,

jsilvap@udg.co.cu

Recibido: 6/3/2019 Aceptado: 4/11/2019

Resumen

El cultivo de la morera constituye una fuente alternativa de alto contenido nutricional para la alimentación animal en las condiciones tropicales. En esta especie se han desarrollado diversos protocolos de propagación, sin embargo, la presencia de contaminantes endógenos en los explantes afectan la eficiencia del establecimiento *in vitro*. La investigación se realizó con el objetivo de definir el tipo de explante a emplear en la fase de establecimiento *in vitro* y optimizar un método de desinfección en la variedad Criolla. Se tomaron yemas apicales y segmentos nodales de la zona basal y central del brote donante de explantes. Luego se evaluó el hipoclorito de sodio (1,0 %) durante 10 minutos, solo o combinado con etanol 70 %. Como resultado la yema apical demostró la menor afectación por contaminantes (20,6 %) lo que favoreció el incremento en la eficiencia (60,3 %) durante el establecimiento *in vitro*. Posteriormente al combinar etanol 70 % durante un minuto seguido de 10 minutos en hipoclorito de sodio 1,0 %, se logró disminuir la contaminación hasta 17,0 % e incrementar la supervivencia (71,0 %) de los explantes de morera variedad Criolla.

Palabras clave: cultivo *in vitro*; medio de cultivo; micropropagación; regeneración

Abstract

The mulberry crop constitutes an alternative source of high nutritional content for the animal feeding under the tropical conditions. In this species diverse propagation protocols have been

developed, however, the presence of endogenous contaminant in the explant affects the *in vitro* establishment efficiency. The investigation was carried out with objective to define the explant type for use in the *in vitro* establishment phase and to optimize a disinfection method of Criolla variety. They took apical bud as well as nodal segments of basal and central from donating bud explant. Then sodium hypochlorite (1.0 %) for 1 min. alone or combined with ethanol 70 % were evaluated. As result the apical bud demonstrated the less contaminant (20.6 %) that favored the efficiency (60.3 %) during *in vitro* establishment. After ethanol 70 % for 1 min., followed 10 min at sodium hypochlorite 1.0 %, it was possible to decrease the contamination up to 17.0 % and increased the explant survival (71.0 %) of mulberry Criolla variety.

Key words: culture medium; in vitro culture; micropropagation; regeneration

Introducción

En Cuba la agricultura desempeña un papel clave en la alimentación animal y humana; sin embargo, no ha sido posible satisfacer la demanda existente, debido a los insuficientes niveles productivos. En este sentido, muchas especies leñosas de alto valor nutritivo y capacidad de producción de biomasa, pueden contribuir a mejorar la calidad de la dieta de los animales, satisfacer la demanda de alimentos en la época de sequía y estimular la aplicación de técnicas de producción animal compatibles con el medio ambiente y los recursos naturales (Hernández *et al.*, 2008).

Entre estas especies se encuentra la morera (*Morus alba* L.), una planta multipropósito que ha recibido poca atención con respecto a su potencial nutritivo, a pesar de estar distribuida en todo el mundo (Medina *et al.*, 2009). Esta especie tradicionalmente se ha propagado por vía asexual pero este método limita la disponibilidad de biomasa comestible para los animales, además se requiere de hasta siete meses para disponer de un nuevo material para corte por lo que su uso está limitado a ciertos meses del año (Desai *et al.*, 2018).

Debido a estas limitantes diversos trabajos refieren que es posible su propagación por medio del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Esta técnica tiene como ventaja la posibilidad de propagar grandes cantidades de plantas a partir de un reducido número de explantes vegetales y en un corto período de tiempo bajo condiciones asépticas. Sin embargo, uno de las principales limitantes de su uso en la propagación de la morera, lo constituye la presencia de contaminantes endógenos en los explantes como hongos y bacterias, que provocan pérdidas económicas en los laboratorios comerciales (Vijayan *et al.*, 2014).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de obtener plantas *in vitro* libres de contaminantes endógenos de *Morus alba* variedad Criolla.

Población y muestra

La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) de la Universidad de Granma, en el período septiembre de 2018 a febrero de 2019.

Se trabajó con el cultivo de la morera variedad Criolla. A partir de plantas donantes, cultivadas en el Banco de Germoplasma del CEBVEG en condiciones de campo (1,0 x 1,0 m) y de 18 meses de edad, se tomaron propágulos de 20-25 cm de longitud.

Para estimular la brotación de las yemas, los propágulos fueron colocados en frascos de vidrio (250 ml) que contenían agua, hasta cubrir un tercio de su longitud. A los 15 días de la brotación y con ayuda de una tijera, se tomaron como explantes yemas apicales y segmentos nodales.

Medios de cultivo:

Los explantes fueron colocados en posición vertical en el medio de cultivo de establecimiento propuesto por Salas *et al.* (2005), que contiene las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) 4,32 g.l⁻¹, sacarosa 30 g.l⁻¹, 6-BAP (6-bencilaminopurina) 0,5 mg.l⁻¹ y Agar 6,0 g.l⁻¹.

Después de cuatro semanas de cultivo, las yemas de cada uno de los brotes formados, fueron individualizadas y transferidas por igual período de tiempo a medio de cultivo de multiplicación con igual composición excepto que se añadió ácido naftalenacético (ANA) 0,5 mg.l⁻¹. El pH fue ajustado a 5,8 con soluciones de NaOH y HCl (1N) antes de la esterilización.

Esterilización:

La esterilización de los medio de cultivo, se realizó en autoclave vertical a 121 °C y 1,2 kgf.cm⁻² de presión por 20 minutos. Posteriormente los frascos con medio de cultivo, se mantuvieron en reposo en la oscuridad durante tres días antes de su uso, para detectar cualquier tipo de contaminación. Las pinzas y bisturíes, se desinfectaron a 300 °C durante cinco minutos en esterilizadores eléctricos que permanecieron en la cabina de flujo laminar.

Condiciones de cultivo:

Los frascos cultivados con morera se colocaron en cámaras de crecimiento con luz solar con un rango de fotoperíodo de 11-12 horas luz, intensidad luminosa 60-70 μmol.m⁻²s⁻¹, humedad relativa de 70 a 80 % y temperatura entre 25 ± 2,0 °C.

Efecto del tipo de explante en el establecimiento *in vitro* de morera

Este experimento se desarrolló con el objetivo de definir el tipo de explante con mejor respuesta en la fase de establecimiento *in vitro* y con la menor afectación de contaminantes microbianos.

Se tomaron como explantes yemas apicales y segmentos nodales procedentes de dos zonas del brote (basal y central), los cuales conformaron tres tratamientos experimentales. Estos fueron colocados en frascos de vidrio que contenían una solución de agua desionizada estéril y detergente durante 10 minutos en agitación constante para eliminar los restos de suciedad; luego se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar el detergente.

La desinfección se realizó en condiciones asépticas de cabina de flujo laminar con hipoclorito de sodio (NaClO) 1% durante 10 minutos al finalizar se enjuagaron cuatro veces con agua desionizada estéril. Una vez desinfectados los explantes fueron reducidos a un tamaño de 1,5 cm de longitud. Al concluir la desinfección, los explantes fueron colocados en frascos de vidrio que contenían medio de cultivo de establecimiento a razón de un explante por frasco.

A las cuatro semanas de cultivo se cuantificó el número de explantes con presencia de contaminación microbiana (%), número de explantes brotados (%), número de yemas, número de hojas y longitud del brote (cm).

Influencia del desinfectante en el establecimiento in vitro de morera

Este experimento tuvo como objetivo evaluar la efectividad del hipoclorito de sodio solo o combinado con el etanol, en la desinfección del tipo de explante que mejor resultado obtuvo en el experimento anterior. Para ello, se utilizó el NaClO (1,0 %) durante 10 min (control), solo o combinado con etanol al 70 %, este último durante un minuto. En ambos casos se emplearon 20 explantes o réplicas por tratamiento, cultivados en medio de cultivo de establecimiento.

Al concluir las cuatro semanas de cultivo, se cuantificó el número de explantes contaminados (%) y el porcentaje de supervivencia de los explantes brotados.

Análisis estadístico

Se conformaron experimentos con un diseño completamente al azar con tres repeticiones experimentales. Para determinar si los datos cumplían los supuestos de normalidad se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, y para la homogeneidad de varianza la prueba de Levene. Como los datos no cumplían ambos supuestos se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y la comparación de medias se realizó según Mann-Whitney ($p < 0,05$). Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15 para Windows.

Análisis de los resultados

Efecto del tipo de explante en el establecimiento *in vitro* de morera

Se observó diferencias significativas en la respuesta *in vitro* entre los diferentes tipos de explantes evaluados. En el tratamiento con segmentos nodales procedentes de la zona basal, solo fue posible la formación de un brote y prácticamente en su totalidad fueron contaminados. Este resultado refleja la existencia de una alta presencia de contaminantes en esta zona, atribuido a la cercanía del explante con el agua utilizada para estimular la brotación del brote, lo que pudo favorecer el incremento de contaminantes.

En estos explantes la presencia de microorganismos contaminantes estuvo marcada por la presencia de hongos filamentosos que llegaron hasta cubrir el explante, así como bacterias las cuales fueron liberadas formando un halo visible en el interior al medio de cultivo y además crecieron sobre el medio de cultivo alrededor del explante, dando una apariencia de turbidez en la zona contaminada (Fig. 1).

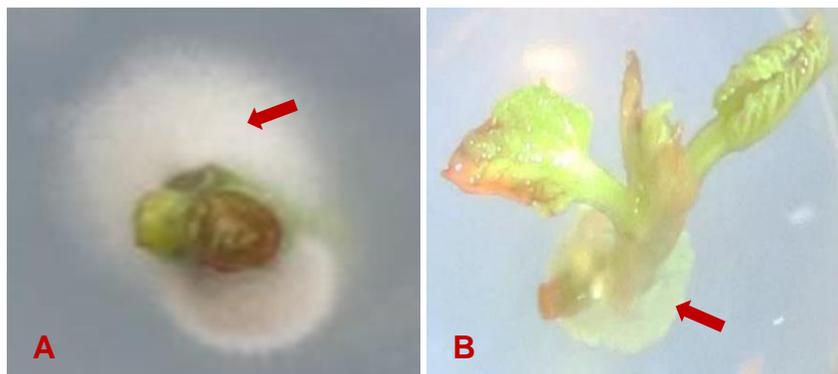
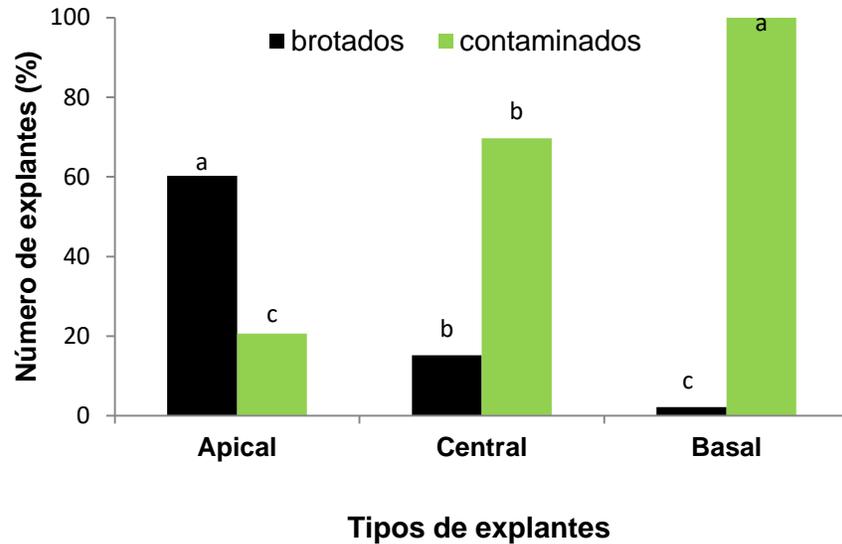


Fig. 1. Brotes *in vitro* de *Morus alba* variedad Criolla con presencia de contaminantes fúngicos (A) y bacteriano (B) en medio de cultivo de establecimiento a los 10 días de cultivo

Por el contrario se evidenció la formación de brotes organogénicos en los tratamientos con empleo de yemas apicales y segmentos nodales procedentes de la zona central del brote, aunque la mayor respuesta ocurrió en los explantes apicales con diferencias significativas entre ambos. El 69,7 % de los segmentos nodales centrales, se contaminaron con bacterias lo que pudo ser una de las causas que causó la inhibición de los brotes; el 30,3 % no se contaminó, pero tampoco logró inducir la formación de brotes. El 15,15 % de las yemas de la región central formaron brotes, sin contaminantes visibles en el medio de cultivo (Fig. 2).

Por el contrario, la mayor respuesta en la formación de brotes y menor porcentaje de contaminación, ocurrió en el tratamiento con yemas apicales. En este tratamiento la eficiencia de brotación alcanzó el 60,3 % y se logró que el 79,4 % de los explantes estuvieran libres de

contaminantes. Esto demuestra que el uso de yemas apicales redujo a 20,6 % el número de explantes contaminados con diferencias significativas respecto a las yemas de la región central y basal (Fig. 2).



Letras desiguales difieren para $p < 0,05$ según la prueba de Kruskal-Wallis/ Mann-Whitney

Fig. 2. Respuesta de los diferentes tipos de explantes de *Morus alba* variedad Criolla en medio de cultivo de establecimiento a los 28 días de cultivo

Los brotes procedentes de la zona central se caracterizaron por presentar un callo basal, una media de tres a cuatro yemas, aproximadamente cuatro hojas, una longitud total alrededor de 1,7 cm y mantuvieron la coloración verde de la especie (Fig. 3). El 94,7 % de los explantes brotados a partir de yemas apicales no formaron callos basales lo que permite una mejor absorción de los nutrientes del medio de cultivo. En cuanto a la longitud del brote, número de hojas y yemas axilares en brotes obtenidos a partir de yemas apicales, no se observó diferencias significativas respecto a los obtenidos de segmentos nodales centrales (Fig. 3).

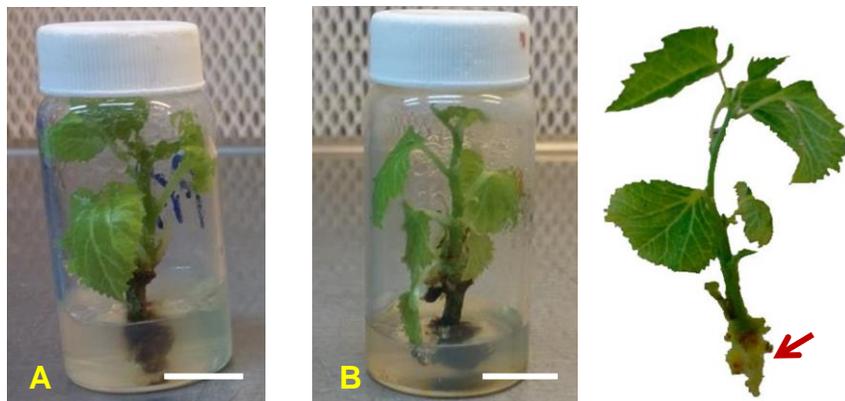


Fig. 3. Plantas *in vitro* obtenidas a partir de yema apical (A) y segmento nodal central (B) de *Morus alba* variedad Criolla con presencia de callo basal (C) a los 28 días de cultivo. Barra = 1,0 cm

Este efecto de la contaminación fue descrita previamente por Gogoi *et al.* (2017), quienes plantearon que los explantes colectados a partir de plantas de campo están asociados principalmente a la presencia de contaminantes fúngicos. Incluso observaron que después de tres a cuatro semanas de cultivo aparecían contaminantes microbianos en segmentos nodales previamente establecidos *in vitro*.

En la práctica, los explantes iniciales solamente son esterilizados superficialmente, y los microorganismos endógenos como las bacterias que continúan vivos en los intercelulares son introducidos al cultivo *in vitro*. Por eso si aparecen síntomas de bacterias colonizando los tejidos vegetales en un corto período de tiempo, los explantes contaminados deben ser eliminados inmediatamente. En caso que el crecimiento bacteriano sea muy lento o temporalmente retardado en las condiciones de cultivo de tejidos, estos se mantienen en un estado críptico y pueden aparecer cuando las condiciones de cultivo cambien drásticamente, por ejemplo después de realizar un subcultivo, incrementar la temperatura, cambiar la composición del medio de cultivo o debido a otros factores (Kałużna *et al.*, 2013).

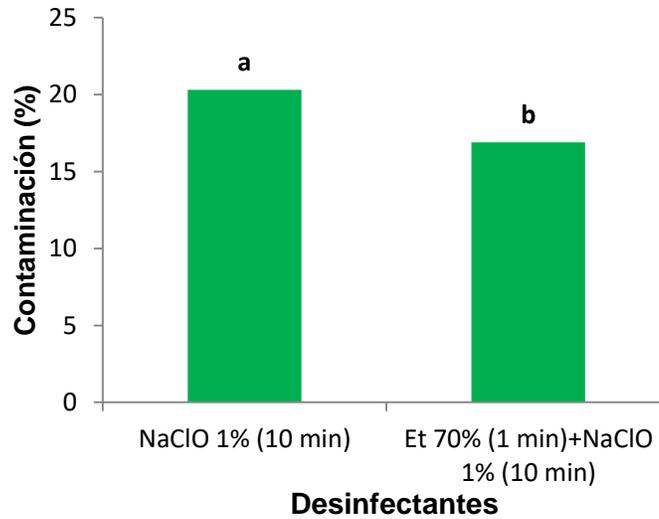
Existen referencias de que diferentes variedades de morera han sido propagadas con empleo de explantes tales como yemas axilares y meristemas apicales (Rohela *et al.*, 2018). Según estos autores, el empleo de altas concentraciones de 6-BAP, resultó en la formación de un callo basal e inhibición de la yema axilar en segmentos nodales de la variedad PPR-1.

Esto pudiera estar relacionado con un incremento endógeno de la concentración de auxina, que unido a la adición exógena de auxinas y citoquininas pudo provocar la división celular descontrolada dando lugar a la masa callosa. Esta condición en los explantes es no deseada, ya que las raíces que se forman a partir de estas estructuras son de baja calidad al no ser totalmente funcionales.

Como resultado la yema apical tuvo la menor afectación por contaminantes lo que favoreció el incremento en la eficiencia durante el establecimiento *in vitro* de morera variedad Criolla.

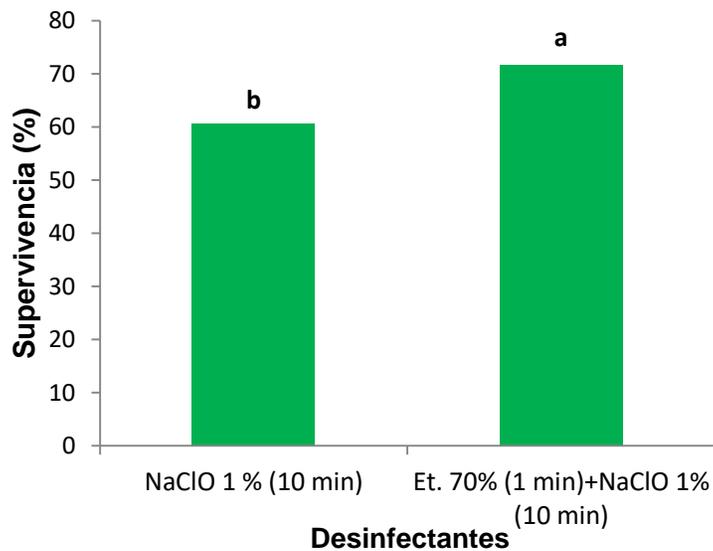
Influencia del desinfectante en el establecimiento *in vitro* de morera

En este experimento se encontró que el empleo del hipoclorito de sodio contribuyó a disminuir la contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de la morera. Se logró reducir la contaminación hasta un 15 % en el tratamiento donde se utilizó el etanol 70 % (1 minuto) seguido de NaClO 1% durante 10 minutos (Fig. 4).



Letras diferentes sobre la barras difieren significativamente según la prueba de U de Mann-Whitney ($p < 0,05$)
Fig. 4. Efecto del hipoclorito de sodio solo o combinado con etanol sobre la contaminación de yemas apicales de morera variedad Criolla a los 28 días de cultivo

En este experimento también fue posible obtener los mayores valores de supervivencia en el tratamiento que incluyó el etanol 70 %, con diferencias significativas respecto al tratamiento que contenía únicamente el hipoclorito de sodio (Figura 5). Esto pudiera estar atribuido a que al disminuir la presencia de contaminantes microbianos, disminuyen los compuestos tóxicos que estos patógenos pueden liberar al medio de cultivo y que pudieran tener efectos fitotóxicos en el tejido vegetal.



Letras desiguales sobre las barras difieren significativamente según prueba de U de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Figura 4. Efecto del hipoclorito de sodio solo o combinado con etanol sobre la supervivencia de los brotes de yemas apicales de morera variedad Criolla a las cuatro semanas de cultivo

Estos resultados son comparables con los descritos por Sales *et al.* (2004), quienes refieren que la combinación de etanol e hipoclorito de sodio proporcionó los mejores resultados en las variables evaluadas en comparación a los tratamientos donde no se incluyó el etanol. La contaminación microbiana constituye un serio problema en el establecimiento y supervivencia de las plantas cultivadas *in vitro*, que provoca una seria afectación en el crecimiento incluso hasta la muerte del tejido vegetal (Gutiérrez *et al.*, 2015; Orlikowska *et al.*, 2017).

No obstante, los resultados alcanzados son inferiores a los descritos por García *et al.* (2002) quienes refirieron una supervivencia máxima de 98,11 % en yemas de morera expuestas a etanol 70 % por un minuto, pero a diferencia del presente trabajo incluyeron hipoclorito de sodio (0,01 %) y una gota de Tween-80 por 15 minutos, seguido de cinco minutos en bicloruro de mercurio al 0,01%.

Al respecto, Sanginés *et al.* (1999) observaron altos niveles de contaminación en los tejidos de morera a pesar de las altas concentraciones de cloro comercial aplicadas, y sólo lograron reducir un 20 % la contaminación al asperjar las plantas donantes en campo con el fungicida Agrimicin 500.

Otro elemento a tener en cuenta es la época del año en que se realiza la selección de los explantes. Según Vijaya-Chitra y Padmaja (2002), en yemas apicales de morera tratadas con etanol al 70 % durante un minuto seguido de 15 minutos en bicloruro de mercurio (0,1%), obtuvieron 40 % de contaminación en la época de invierno, 25 % en otoño y 15 % en verano.

En conclusión al combinar el etanol con hipoclorito de sodio en el proceso de desinfección, fue posible reducir la contaminación y aumentar la supervivencia de los explantes.

Conclusiones

1. Se definió las yemas apicales como el tipo de explante a emplear en el establecimiento *in vitro* de morera variedad Criolla.
2. Se logró disminuir la contaminación hasta 17,0 % e incrementar la supervivencia (72,0 %) de los explantes, al combinar etanol al 70 % durante un minuto, seguido de 10 minutos en hipoclorito de sodio al 1,0 %.

Agradecimientos:

Los autores agradecen al profesor Dr. Stefaan Werbrouck, por el apoyo financiero recibido del programa VLIR coordinado por la Universidad de Ghent, Bélgica en el marco del proyecto “Biotecnología *in vitro* de plantas para el incremento de la seguridad alimentaria en la región oriental de Cuba”.

Referencias bibliográficas

- 1) Desai, S., Desai, P., Mankad, M., Patel, A., Patil, G. y Narayanan, S. (2018). Development of micropropagation protocol for *Morus nigra* L. (black mulberry) through axillary buds. *International Journal of Chemical Studies*, 6(2): 585-589.
- 2) García, M., Prieto, M., Lugo, Y., Miliam, L. y Cepero, L. (2002). Estudios preliminares sobre micropropagación de *Morus alba*. Una nueva contribución para el ecosistema ganadero. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. <http://lead.virtualcentre.org/es/en/BTJ%20Taller/garciamayneivis.htm>
- 3) Gogoi, G., Borua, P.K. y Al-Khayri, J.M. (2017). Improved micropropagation and *in vitro* fruiting of *Morus indica* L. (K-2 cultivar). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 249-256. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.02.005
- 4) Gutiérrez, Y., Torres, Y., Robaina, A., Bauta, M., Rayas, A., Santos, A., Basail M., López, J., Mederos, V., Beovides, Y. y Rodríguez, D. (2015). Incidencia de contaminantes microbianos en la propagación *in vitro* de *Xathosoma* spp. clon ‘INIVIT MX-2007’ y *Colocasia esculenta* (L.) Schott. clon ‘INIVIT MC-2012’. *Biotecnología Vegetal*, 15(3): 157-161.
- 5) Hernández, R., Jardines, S. y Hernández, Y. (2008). Tecnologías sostenibles para la producción de leche en regiones tropicales. <http://monografias.umcc.cu/monos/2008/Agronomia/m0819.pdf>. Consultado: 7 de enero de 2019.
- 6) Kałużna, M., Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Zawadzka, M., Zenkteler, E. y Orlikowska, T. (2013). Detection, isolation, and preliminary characterization of bacteria contaminating plant tissue cultures. *Acta Agrobotanica*, 66(4): 81–92.
- 7) Medina, M., García, D., Morantinos, P. y Cova, L. (2009). La morera (*Morus* spp.) como recurso forrajero: Avances y consideraciones de investigación. *Zootecnia Tropical*, 27(4): 343-362.
- 8) Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plant*, 15(3): 473-497.

- 9) Orlikowska, T., Nowak, K. y Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 128:487–508.
- 10) Ramesh, H.L. y Yogananda, V.N. (2014). Induction of Colchipooids in Mulberry (*Morus*) variety Kajali in C₁ Generation. *International Journal of Advanced Research*, 2(4): 468-473.
- 11) Rohela, G.K., Shabnam, A.A., Shukla, P., Aurade, R., Gani, M., Yelugu, S. y Sharma, S.P. (2018). *In vitro* clonal propagation of PPR-1, a superior temperature mulberry variety. *Indian Journal of Biotechnology*, 17: 619-628.
- 12) Salas, E., Agramonte, D., Barbón, R., Jiménez, F., Collado, R., Pérez, M. y Gutiérrez, O. (2005). Propagación *in vitro* de *Morus alba* L. en medio de cultivo semisólido. *Bioteología Vegetal*, 5(2): 81 – 87.
- 13) Sanginés, G., Lara, L., Rivera, L., Pinzón, L., Ramos, T., Murillo, J., Fuentes, C. y Azcorra, G. (1999). Avances en los programas de investigación en morera (*Morus alba* L.) en Yucatán. I Congreso Internacional sobre Morera. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. Matanzas
- 14) Vijaya-Chitra, D.S. y Padmaja, G. (2002). Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry. *Scientia Horticulturae*, 92: 55-68.
- 15) Vijayan, V. K., Jayarama, P., Tikader, A. y Saratchandra, B. (2014) Biotechnology of mulberry (*Morus* L.) - An appraisal. *Emir. J. Food Agric.*, 26(6): xxx-xxx. doi: 10.9755/ejfa.v26i5.15722