

Efecto estimulador de microorganismos eficientes en plantas *in vitro* de ñame en fase de aclimatización (Original)

Stimulating effect of effective microorganisms on *in vitro* plants of yam in acclimatization phase (Original)

Leydis González Milán. Ingeniera agrónoma. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba.

lgonzalezm@udg.co.cu 

Dailé Dolores Cabrera Rodríguez. Licenciada en Biología. Máster en Química Biológica.

Profesor Asistente. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba. dcabrerar@udg.co.cu 

Misterbino Borges García. Licenciado en Biología. Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor

Titular. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba. misterbinobgarcía@gmail.com 

María de los Ángeles Jiménez Pizarro. Ingeniera agrónoma. Doctor en Ciencias Agrícolas.

Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba. mjimenezp@udg.co.cu 

Recibido: 22-04-2024/Aceptado: 30-05-2024

Resumen

Los microorganismos eficientes son una alternativa viable para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible. En el artículo se evalúa el efecto de microorganismos eficientes en la aclimatización de plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco. Se utilizaron 60 plantas *in vitro* por tratamiento: T1, plantas *in vitro* sumergidas cinco minutos en ME al 1% provenientes de ecosistemas naturales de montaña de la Sierra Maestra, Cuba; T2, plantas *in vitro* sumergidas cinco minutos en ME al 1 % + aplicación de ME al 5 % en riego días alternos hasta 45 días de aclimatización; T3, aplicación de ME al 10 % en riego días alternos hasta 45 días de aclimatización; T4, control sin aplicación de ME. La aplicación de ME 10 % en riego días

alternos hasta 45 días de aclimatización, fue el único tratamiento con un efecto sobre las variables morfológicas número, largo y ancho de las hojas, número de yemas, largo del tallo, número y largo de las raíces de las plantas *in vitro* de ñame, con diferencias estadísticas significativas con relación al resto de los tratamientos. El grosor del tallo en los tratamientos 2 y 3 no difirieron estadísticamente, pero sus valores medios sí se diferenciaron significativamente del resto de los tratamientos. Esto demuestra el efecto positivo de la concentración de ME 10 % aplicada en el riego durante 45 días en plantas cultivadas en un sustrato no enriquecido con nutrientes.

Palabras clave: agricultura sostenible; biotecnología agrícola; biofertilizantes; micropropagación.

Abstract

Efficient microorganisms are a viable alternative to achieve ecologically sustainable agricultural development. The objective of the work was to evaluate the effect of Efficient Microorganisms on the acclimatization of *in vitro* plants of Chino Blanco clone yam. Were used 60 *in vitro* plants per treatment: T1 *in vitro* plants submerged for five minutes in 1 % ME from natural mountain ecosystems of the Sierra Maestra, Cuba; T2 *in vitro* plants submerged for five minutes in 1 % ME + application of 5 % ME in irrigation every other day until 45 days of acclimatization; T3 application of 10 % ME in irrigation every other day until 45 days of acclimatization; T4 control without ME application. The application of ME 10 % in irrigation on alternate days up to 45 days of acclimatization was the only treatment with an effect on the morphological variables number, length and width of leaves, number of buds, stem length, number and length of roots of the *in vitro* yam plants, with significant statistical differences with the rest of the treatments. The stem thickness in treatments 2 and 3 did not differ statistically but their mean values did differ significantly from the rest of the treatments. This demonstrates the positive effect of the 10 %

ME concentration applied in irrigation for 45 days on plants grown in a substrate not enriched with nutrients.

Keywords: sustainable agriculture; agricultural biotechnology; biofertilizers; micropropagation.

Introducción

Hoyos et al. (2008, citados por Morocho & Leiva, 2019) consideran que los microorganismos eficientes o ME (sigla en inglés para *Efficient Microorganism*) son: "(...) productos formulados líquidos que contienen más de 80 especies de microorganismos, algunas especies son aeróbicas, anaeróbicas e incluso especies fotosintéticas productoras de ácido láctico, levaduras, actinomicetos y hongos (...)" (p.94).

Alarcon et al. (2019, citados por Mamani, 2023) exponen que los estudios relacionados con los ME se realizan con la finalidad de: "(...) proporcionar evidencia científica robusta para respaldar la eficacia y aplicabilidad de los biofertilizantes en diversas condiciones agrícolas de manera que permitan su uso como complemento de la fertilización sintética, de manera que pueda ser sustituida a largo plazo" (p. 44).

Existen referencias del empleo de microorganismos eficientes en los sistemas de producción de semillas biotecnológicas de ñame. En este cultivo las técnicas de propagación convencional no garantizan la producción de volúmenes de material vegetal de plantación con calidad fisiológica, sanitaria y genética en periodos cortos. Por este motivo, muchos países, incluido Cuba, emplean métodos biotecnológicos para la producción de plantas *in vitro* y microtubérculos (Tamiru et al., 2006 & Perea, 2001, citados por González, 2012).

Sin embargo, la aclimatación *ex vitro* es una etapa fundamental en el protocolo de propagación *in vitro*, porque de ella depende la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas (Pineda et al., 2018). La eficiencia de esta etapa, depende de varios factores,

entre ellos, la elección del sustrato y la obtención de una relación adecuada entre los componentes de la mezcla, que asegure una buena supervivencia (Cortegaza, 2013, citado por Pineda et al., 2018). Al respecto las publicaciones científicas refieren que las tasas de supervivencia y de enraizamiento siguen siendo generalmente bajas e inestables.

En tal sentido, el uso de los microorganismos eficientes pudiera ser una alternativa viable para resolver estos problemas. En Cuba se han probado diferentes bioproductos que han revelado su efectividad y contribuido a una mejor disposición de la calidad funcional de los tejidos en la fase de aclimatización de plantas *in vitro* de *Saccharum* spp. cultivar C87-51 (Gómez et al., 2019) y *Musa acuminata* clon Gran Enano (Portuondo, 2022).

En la literatura científica es escasa la información sobre el uso de los ME en la aclimatización de plantas *in vitro* de ñame. Algunos autores han experimentado la inoculación de rizobacterias nativas, las cuales han tenido efectos positivos en el crecimiento de plantas *in vitro* de *Dioscorea rotundata* (Sánchez & Pérez, 2018), mientras que bajo condiciones de campo y en semillas provenientes de segmentos de tubérculo, estos microorganismos estimularon la producción de tubérculos (Sánchez et al., 2021).

Teniendo en cuenta estos elementos, en el artículo se evalúa el efecto de los microorganismos eficientes en la aclimatización de plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Agrícola, ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Granma, Bayamo, Granma, Cuba. Se utilizaron plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco, obtenidas en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de dicha institución.

Después de concluir la etapa de enraizamiento *in vitro* y cumplir con los requerimientos morfológicos para su cultivo en condiciones *ex vitro*, se procedió a extraer las plantas de los frascos de cultivo con ayuda de pinzas y las raíces fueron lavadas con abundante agua para eliminar los restos del medio de cultivo. Previo al trasplante y/o durante la fase de aclimatización, las plantas fueron tratadas con microorganismos eficientes provenientes de ecosistemas naturales de montaña de la Sierra Maestra en Cuba. A continuación se describen los tratamientos objetos de estudio:

- T1: Plantas *in vitro* sumergidas en ME (1 %) cinco minutos.
- T2: Plantas *in vitro* sumergidas en ME (1 %) cinco minutos + aplicación de ME (5 %) en el agua de riego hasta los 45 días de aclimatización.
- T3: Aplicación de ME (10 %) en el agua de riego hasta 45 días de aclimatización.
- T4: Control sin aplicación de microorganismos eficientes

Las plantas fueron cultivadas en bandejas de polieturano de 120 cm³ con la capacidad deseada, que contenían como único sustrato suelo Vertisol. En todos los casos se utilizó un tamaño de muestra de 60 plantas por tratamiento y cada planta se consideró una réplica experimental. Para mantener un ambiente con alta humedad relativa y disminuir las pérdidas de agua por evapotranspiración, las plantas fueron cubiertas con frascos de vidrio hasta lograr su endurecimiento durante los primeros 15 días. El riego se realizó con una frecuencia en días alternos, de forma manual y con ayuda de una regadera en todos los tratamientos.

Los parámetros morfológicos evaluados, en todos los casos a los 45 días de cultivo en aclimatización, fueron en las hojas: número, largo y ancho; en el tallo: longitud, grosor y número de yemas; y en las raíces: número y longitud. Para las variables de medición largo y ancho se utilizó una regla milimetrada, mientras que para el grosor del tallo se empleó un pie de rey.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado y se aplicó un análisis de varianza clasificación simple. Fueron verificados los supuestos de normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado y la homogeneidad de varianza según la prueba de Levene ($p > 0,05$), con el paquete estadístico InfoStat versión 2020. Cuando se cumplieron ambos supuestos, se realizó la comparación de medias de los tratamientos con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). En el caso contrario, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la comparación de medias según la prueba de Conover con un nivel de significancia $p < 0,05$.

Análisis y discusión de los resultados

La aplicación de los microorganismos eficientes objeto de estudio, mostró un efecto estimulador en plantas de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco, provenientes del cultivo *in vitro*, independientemente de las dosis de microorganismos y de los momentos de aplicación.

Las plantas tratadas con la máxima concentración de ME en el agua de riego, incrementaron significativamente el largo, ancho y número de hojas, con diferencias estadísticas significativas respecto a los demás tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de microorganismos eficientes en el número, largo y ancho de hojas de plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco en fase de aclimatización a los 45 días de cultivo

Tratamientos	Número de hojas (U)	Largo de la hoja (cm)	Ancho de la hoja (cm)
1. ME (1 %) 5 minutos	3,10 b	3,72 b	2,64 b
2. ME (1%) 5 minutos + Riego ME (5 %)	3,18 b	3,95 b	2,76 b
3. Riego ME (10 %)	4,42 a	4,87 a	3,43 a
4. Control	3,29 b	3,80 b	2,97 b
±E.E	0,21	0,28	0,10

Leyenda: Letras iguales en una misma columna no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

Fuente: elaboración propia.

Una respuesta similar ocurrió en las variables número de yemas y longitud del tallo, donde el tratamiento tres mantuvo la mejor respuesta en comparación con los demás tratamientos. Esto demuestra que para lograr una mayor efectividad de este bioproducto, se

requiere una concentración de microorganismos eficientes en el agua de riego superior a la empleada en el tratamiento dos (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de microorganismos eficientes en el número de yemas y en la longitud del tallo de plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco en fase de aclimatización a los 45 días de cultivo

Tratamientos	Número de yemas (U)	Longitud del tallo (cm)
1. ME (1 %) 5 minutos	2,33 b	3,50 b
2. ME (1%) 5 minutos + Riego ME (5 %)	2,91 b	3,26 b
3. Riego ME (10 %)	3,50 a	4,64 a
4. Control	2,29 b	2,87 b
± E.E	0,25	0,34

Leyenda: Letras iguales en una misma columna no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

Fuente: elaboración propia.

Es posible que la aplicación alterna de los ME en el riego contribuya a una mayor acumulación de microorganismos en el sustrato, lo que permitirá una mayor interacción planta-microorganismos que beneficiará la respuesta morfofisiológica de las plantas. Por el contrario, las concentraciones inferiores a 1 % y 5 %, independientemente del momento de aplicación, no fueron suficientes para aumentar la colonización de estos microorganismos. En el caso del tratamiento 1, se realizó una aplicación única por inmersión de las plantas durante cinco minutos, lo que minimizó las posibilidades de una inoculación efectiva.

Estos resultados también pudieron estar influidos por las condiciones de estrés de un sustrato no enriquecido con abonos orgánicos, a partir del cual los ME no pudieron tomar los nutrientes necesarios para una mayor eficiencia en la estimulación del crecimiento.

Los resultados corroboran que: "la inoculación de cultivos de microorganismos eficientes al ecosistema suelo-planta, mejora la calidad y salud del suelo y el crecimiento, producción y calidad de los productos" (Abreu et al., 2021, p. 2). Las evidencias científicas indican que estos microorganismos han sido más eficaces cuando se aplican conjuntamente con enmiendas orgánicas para proporcionar carbono, oxígeno y energía (Morocho & Leiva, 2019).

A diferencia de las variables anteriores, los tratamientos con empleo de microorganismos eficientes mostraron diferencias estadísticas significativas y su efecto superó al tratamiento control. Los tratamientos 2 y 3 tuvieron la mayor respuesta, sin existir diferencias entre ellos; en ambos casos se aplicaron los microorganismos en el agua de riego, independientemente de una inoculación , previa o no, al sumergir las plantas durante cinco minutos en una disolución de ME al 1 % (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de microorganismos eficientes en el grosor de plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco en fase de aclimatización a los 45 días de cultivo

Tratamientos	Grosor del tallo (mm)
1. ME (1 %) 5 minutos	0,14b
2. ME (1%) 5 minutos + Riego ME (5 %)	0,20 a
3. Riego ME (10 %)	0,23 a
4. Control	0,10 c

Leyenda: Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba de Conover, ($p < 0,05$)

Fuente: elaboración propia.

Shankar et al. (2011, citados por Gómez et al., 2019) refieren que la literatura científica consultada explica que:

(...) los biofertilizantes son productos elaborados a base de microorganismos que viven en el suelo, en poblaciones bajas. Cuando estas se incrementan de forma artificial, ponen a disposición de las plantas, mediante su actividad biológica, una parte importante de las sustancias nutritivas que necesitan para su desarrollo y suministran sustancias hormonales o promotoras del crecimiento. (p.4)

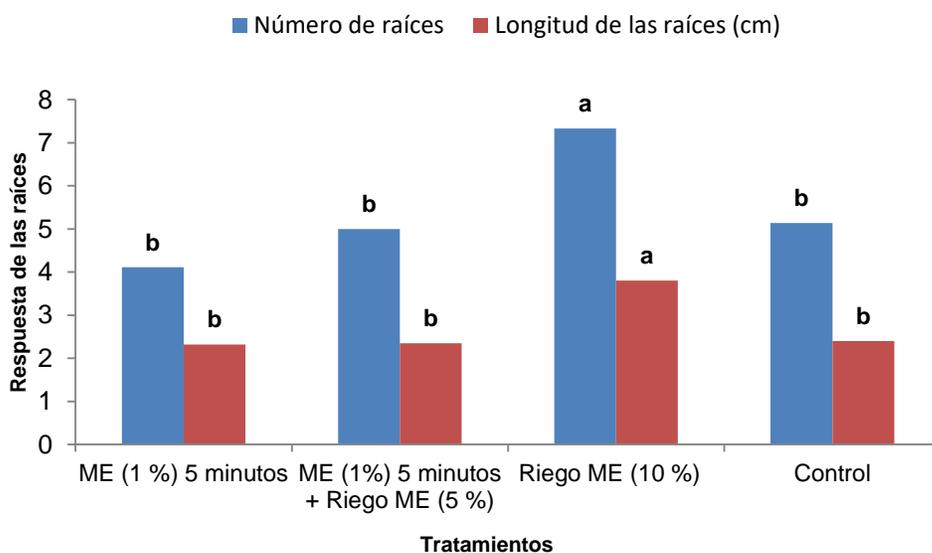
Al respecto, añade Portuondo (2022) que tales resultados pueden deberse a que:

(...) los procesos de alargamiento y división celular son llevados a cabo por medio de hormonas entre las que se encuentran la auxina y giberelinas que intervienen en la división de las células que se van adicionando a los tejidos primarios para formar los

tejidos adultos secundarios y como consecuencia se produce un crecimiento secundario en el grosor del tallo y por otra parte al elevado contenido en fibra, macro y micronutrientes, aminoácidos, vitaminas y fitohormonas vegetales que están presentes en el bioproducto, los cuales actúan como articulación en los procesos que desencadenan los mecanismos que estimulan el proceso fisiológico de las plantas. (p. 5)

En cuanto al número y longitud de raíces, el tercer tratamiento también mostró una tendencia semejante a las variables anteriores, lo que ratifica la necesidad de una mayor concentración de microorganismos en el sustrato para estimular la respuesta de las variables morfológicas (Figura 1).

Figura 1. Efecto de microorganismos eficientes en el número y la longitud de las raíces de plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco en fase de aclimatización a los 45 días de cultivo



Leyenda: Letras diferentes difieren significativamente según la prueba de Conover, ($p < 0,05$)

Fuente: elaboración propia.

En Cuba, Gómez et al. (2019) evidenciaron:

Un efecto positivo del Lebame en la aclimatización del cultivar C87-51 que superó al control en las variables de calidad evaluadas, con la excepción del diámetro del tallo y la

longitud de la hoja, sin encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, las diluciones del bioproducto estudiadas no presentaron diferencias estadísticas entre ellas, por lo que con 8 ml.L⁻¹ de este fue suficiente para obtener plantas *in vitro* con la calidad requerida (p.1) y acortar el tiempo de las mismas en esta fase de la propagación *in vitro*.

Como se muestra, las plantas de ñame tuvieron un normal desarrollo sin alteración en los parámetros morfológicos típicos de la especie. Estas plantas, aunque provenían de una etapa de enraizamiento *in vitro*, alcanzaron un mayor desarrollo y funcionalidad en condiciones de cultivo *ex vitro*, con un incremento en la accesibilidad de los nutrientes, lo que pudo estar influido por el biofertilizante (Figura 2).

Figura 2. Plántulas de ñame clon Chino Blanco aclimatadas con la aplicación de microorganismos eficientes al 10 %, con riego en días alternos durante 45 días de cultivo



Fuente: elaboración propia.

En estudios previos sobre inoculación bacteriana en plantas de ñame, se refieren los efectos beneficiosos de los ME sobre el crecimiento de las plantas, tanto por la aplicación en el suelo como por la inmersión de las raíces. En la especie *D. rotundata*, al ser inoculada por inmersión en una solución con *Bacillus subtilis* aislados de la microflora del estiércol vacuno, se

favoreció, en comparación con las plantas controles no inoculadas, la brotación, así como el largo y peso tanto de las raíces como de los brotes (Liswadiratanakul et al., 2023).

Por otro lado, varios autores sugieren que la colonización y el efecto promotor del crecimiento pueden ser afectados por el método de inoculación utilizado. Al comparar la inoculación de semillas, la inoculación del suelo, la inoculación de la rizosfera y la inoculación foliar con *Burkholderia phytofirmans* en plantas de *Lolium multiflorum* Lam. cultivadas en suelos contaminados con petróleo, pudo establecerse que, aunque mejoró la producción de biomasa y la degradación del hidrocarburo, el método de la inoculación del suelo resultó ser el más efectivo con respecto a los otros tres métodos de inoculación, ya que mostró una mayor colonización en la rizosfera y la endosfera de la raíces de las plantas hospederas (Liswadiratanakul et al., 2023).

Con relación al efecto de los microorganismos eficientes en los sistemas suelo-planta, Luna y Mesa (2016) señalan que:

Los microorganismos eficientes, como inoculante microbiano, restablecen el equilibrio microbiológico del suelo, mejoran sus condiciones físico-químicas, incrementan la producción de los cultivos y su protección, además conservan los recursos naturales, generan una agricultura y medio ambiente más sostenible (...) y provocan el incremento de las variables productivas. (p.31)

Conclusiones

1. El bioproducto basado en microorganismos eficientes, estimuló el crecimiento de las plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco en la fase de aclimatización.

2. La aplicación de microorganismos eficientes al 10 % en el agua de riego en días alternos hasta los 45 días de aclimatización, incrementó significativamente todas las variables morfológicas evaluadas en hojas, tallos y raíces.

Referencias bibliográficas

Abreu, N., Meriño, A., Matos, K., Urgelles, I. & Sánchez, E. (2021). Evaluación de diferentes dosis de microorganismos eficientes en vitroplantas de plátano fruta enano en condiciones de campo. *Cub@: Medio Ambiente y Desarrollo*, 21(40).

<https://cmad.ama.cu/index.php/cmada/article/view/302>

Gómez, R., Bernal, A., Reyes, C. F., Núñez, D., Bermúdez, M., Cardenas, Y., Macado, P. & Castillo, R. (2019). Efecto de los microorganismos eficientes Lebame, en la aclimatización *ex vitro* de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) cultivar C87-51. *Revista ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 53(3).

<https://www.revista.icidca.azcuba.cu/wp-content/uploads/2020/05/art%C3%ADculo-2-2.pdf>

González, M. E. (2012). El ñame (*Dioscorea spp.*). Características, usos y valor medicinal.

Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 5-15.

<http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v33n4/ctr01412.pdf>

Liswadiratanakul, S., Yamamoto, K., Wattanadatsaree, V., Shiwa, Y. & Shiwachi, H. (2023).

Effects of two different inoculation methods using a synthetic essential core bacterial community on water yam (*Dioscorea alata* L.). *Trop. Agr. Develop.*, 67(2), 31-37.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsta/67/2/67_31/_pdf/-char/en

- Luna, M. A. & Mesa, J. R. (2016). Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Revista Científica Agroecosistemas*, 4(2), 31-40.
<https://aes.ucf.edu/cu/index.php/aes/article/download/84/115/181>
- Mamani, A. (2023). Biofertilizantes a base de microorganismos beneficiosos y materia orgánica: una revisión sistemática. *Revista Acciones Médicas*, 2(4), 43-55.
<https://doi.org/10.35622/j.ram.2023.04.004>
- Morocho, M. T. & Leiva, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46(2), 93-103.
<http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v46n2/0253-5785-cag-46-02-93.pdf>
- Pineda, E., Acosta, F., Fernández, I., Núñez, D., Hernández, A. R., Aday, O. de la C.,
Oceguera, Z., Machado, P., Jiménez, M., Toledo, E. & Más, R. (2018). Nuevo sustrato para la aclimatización de vitroplantas de caña de azúcar. *Centro Agrícola*, 45(3), 32-36.
<http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v45n3/0253-5785-cag-45-03-32.pdf>
- Portuondo, A.Y. (2022). Aplicación de bioproductos en vitroplantas de banano (*Musa acuminata* clon "Gran enano") en fase de aclimatización. *Cub@: Medio Ambiente y Desarrollo*, 22(43). <https://cmad.ama.cu/index.php/cmada/article/view/332>
- Sánchez, D. B., Luna, L. L., Espitia, A. A. & Cadena, J. (2021). Yield response of yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) to inoculation with *Azotobacter* and nitrogen chemical fertilization in the Caribbean region of Colombia. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 47(1), 61-70. <https://www.redalyc.org/journal/864/86468100005/html/>
- Sánchez, D. B. & Pérez, J. V. (2018). Caracterización y evaluación de PGPRs sobre el crecimiento de plántulas de *Dioscorea rotundata* *in vitro*. *Agronomía Costarricense*, 42(2), 75-91. [http:// dx.doi.org/10.15517/rac.v42i2.33780](http://dx.doi.org/10.15517/rac.v42i2.33780)