

# INFLUENCIA DEL PECTIMORF SOBRE LA CALIDAD DE LA SEMILLA ARTIFICIAL DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* sp.)

Mariela Cid<sup>✉</sup>, J. L. González-Olmedo, Yarianne Lezcano y Nadina Nieves

**ABSTRACT.** Pectimorf, a new Cuban bioregulator whose active principle is a mixture of oligosaccharides of pectic origin, having the capacity to induce and develop rooting, to stimulate callus growth and remarkably increase the development and vigour of vitroplants in different cultures, is a promising alternative in crop biotechnology. Therefore, the objective of this work is to determine the effect of single and combined Pectimorf with GA<sub>3</sub> and IAA on the composition of sugarcane artificial seed capsule. The work was made with somatic embryos obtained in calluses from segments of the most internal leaf of sugarcane plants, CP52-43 variety, planted under field conditions with nine months of age. Artificial endosperm became rich with Pectimorf (10 mg.L<sup>-1</sup>), that was combined with GA<sub>3</sub> (0 and 2.0 mg.L<sup>-1</sup>) and IAA (0 and 0.5 mg.L<sup>-1</sup>) and a control treatment without hormones. Results showed a synergic effect of Pectimorf with IAA, which increased in the percentage of capsule germination, without reaction in the oligosaccharide interaction with gibberellin. When Pectimorf was applied as a single one, although it increased the number of plants, it was in detriment of the quality of them; the size, number of leaves and length decreased significantly and at the final evaluation, these capsules presented a high number of deformed plants that was not possible to evaluate.

*Key words:* auxins, sugarcane, endosperm, gibberella, oligosaccharides, plant growth substances

**RESUMEN.** El Pectimorf, un nuevo biorregulador cubano cuyo principio activo es una mezcla de oligosacáridos de origen péctico, que posee capacidad para inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de los callos, e incrementar de forma notable el desarrollo y vigor de las vitroplantas de diferentes cultivos, es una alternativa promisoriosa en la biotecnología vegetal. Es por ello que el objetivo del trabajo es determinar el efecto del Pectimorf solo y combinado con GA<sub>3</sub> y AIA en la composición de la cápsula de la semilla artificial de caña de azúcar. El trabajo se realizó en caña de azúcar, variedad CP52-43, con embriones provenientes de callos obtenidos de segmentos de la hoja más interna de plantas de campo de nueve meses de edad. El endospermo artificial se enriqueció con Pectimorf, a razón de 10 mg.L<sup>-1</sup>, que se combinó con GA<sub>3</sub> (0 y 2.0 mg.L<sup>-1</sup>) y AIA (0 y 0.5 mg.L<sup>-1</sup>). Los resultados del trabajo ponen de manifiesto un efecto sinérgico del Pectimorf con el AIA, lo que se mostró en el incremento del porcentaje de germinación de las cápsulas, sin reacción en la interacción del oligogocárido con la giberelina, aunque en el tratamiento donde se combinan el Pectimorf con ambas hormonas, fue donde se logró la mayor calidad de plantas. El Pectimorf, cuando fue aplicado solo, aunque incrementó el número de plantas producidas, lo hizo en detrimento de la calidad de estas; la talla, el número de hojas y la longitud de estas disminuyó significativamente y, en el momento de la evaluación final, dichas cápsulas presentaron un elevado número de plantas deformadas que no fue posible evaluar.

*Palabras clave:* caña de azúcar, endosperma, gibberella, oligosacáridos, sustancias de crecimiento vegetal

## INTRODUCCIÓN

Las hormonas vegetales, como las auxinas y giberelinas, pueden actuar a través de la activación de enzimas endógenas vegetales, que liberan oligosacáridos

de la pared celular de la planta, siendo estos últimos los que, de manera directa y específica, regulan muchos de los procesos fisiológicos que se observan en la formación de órganos. Estos oligosacáridos no solo desempeñan una función estructural sino que además son liberados durante su degradación, constituyéndose en moléculas señalizadoras de importantes procesos fisiológicos de las plantas, relacionados con el crecimiento y la estimulación de los mecanismos de defensa endógenos contra el ataque de plagas y enfermedades. Este tipo de molécula es conocida en la literatura científica como Oligosacarinas (1).

Ms.C. Mariela Cid y Yarianne Lezcano, Especialistas; Dr.C. J. L. González-Olmedo, Investigador Titular y Nadina Nieves, Investigador Auxiliar del Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplantas, Carr. Morón km 9, CP 69 450, Ciego de Avila, Cuba.

✉ mariela@bioplantas.cu

El Pectimorf se reconoce como un nuevo biorregulador cubano, obtenido a partir de residuos de la industria citrícola, cuyo principio activo es una mezcla de oligosacáridos de origen péctico. La capacidad del Pectimorf para inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de los callos, catalizar la desagregación celular de los callos cuando se desea obtener suspensiones celulares, e incrementar de forma notable el desarrollo y vigor de las vitroplantas de los diferentes cultivos, validan a este como una alternativa promisoriosa en la biotecnología vegetal (2).

Los resultados obtenidos en el cultivo de tejidos de caña de azúcar, café, cítricos, ajo, tomate, plátanos y bananos, demuestran que este producto no solo puede sustituir parcial o totalmente los reguladores de crecimiento tradicionales en los procesos de micropropagación de estos cultivos sino que, en la mayoría de los casos, se obtienen resultados superiores (2, 3, 4, 5). En esta tecnología los reguladores de crecimiento juegan un papel preponderante. Estos son, junto a otros, elementos clave en las diferentes etapas del cultivo *in vitro*. Por lo tanto, la posibilidad de utilizar análogos en el proceso, que pudieran por un lado tener un mayor y mejor efecto y/o menor costo, es algo que está en fase de investigación.

La utilización de la semilla artificial, como fase final del proceso de la embriogénesis somática, es un paso clave dentro de la biotecnología vegetal. En el sistema de semilla artificial, el embrión somático es encapsulado en una matriz de alginato de calcio que lo soporta, protege, permite la manipulación y se le puede adicionar los componentes nutricionales necesarios para los procesos de germinación y conversión. Hasta la fecha, es muy controvertido el tema de la composición de la cápsula artificial, pero es evidente la necesidad del uso de reguladores del crecimiento que ayuden al desarrollo inicial del embrión (6, 7) y luego su total independencia en el medio exterior, para llegar a desarrollar en campo hasta planta completa (8, 9).

El Pectimorf, por sus propiedades ya probadas en diferentes cultivos (3, 4, 5), y en particular en la histodiferenciación de embriones somáticos en la caña de azúcar (10), puede constituir un elemento importante a incorporar en el protocolo de la semilla artificial de la caña de azúcar, como un potenciador de las hormonas sintéticas, un incremento en la calidad de la semilla y un bajo costo adicional, por lo que el objetivo del trabajo es determinar el efecto del Pectimorf solo y combinado con GA<sub>3</sub> y AIA en la composición de la cápsula de la semilla artificial de caña de azúcar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en caña de azúcar, variedad CP52-43, un híbrido proveniente de CP43-64 x CP38-34, Canal Point, FL, USA. Se utilizaron callos provenientes de segmentos de la hoja más interna de plantas cultivadas en el campo de nueve meses de edad. El medio de

formación de callos estuvo compuesto por el medio basal MS (11) enriquecido con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, 50 mg.L<sup>-1</sup> de arginina y 3 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Las condiciones de cultivo fueron en oscuridad y 25 ± 2°C de temperatura.

Callos del tercer subcultivo se pasaron a un medio de diferenciación, compuesto por el medio basal MS complementado con 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA según Tapia *et al.* (6). Estos fueron colocados en oscuridad por siete días y posteriormente a la luz (blanca fluorescente a 50 μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-2</sup> de densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFF)) y 25 ± 2°C de temperatura, hasta la aparición de los estados más avanzados del embrión para su encapsulación.

Para el encapsulado se utilizaron embriones en estado escutelar tardío, los cuales se seleccionaron con la ayuda de un estereomicroscopio. Las cápsulas se formaron a partir de alginato de sodio al 2.5 % en cloruro de calcio 1 % y se procedió según Nieves *et al.* (7).

Los tratamientos ensayados en la cápsula aparecen en la Tabla I, teniendo en cuenta para la dosis del Pectimorf los resultados previos obtenidos en el Centro de Bioplantas.

**Tabla I. Diseño de las combinaciones de AIA, GA<sub>3</sub> y Pectimorf**

GA <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	AIA (mg.L <sup>-1</sup> )	Pectimorf (mg.L <sup>-1</sup> )
2.0	0.5	0
2.0	0.5	10.0
2.0	0.0	10.0
0	0.5	10.0
0	0	10.0

Las cápsulas germinadas se pasaron a frascos sobre un medio basal MS para el desarrollo de las plantas y su posterior evaluación a los 35 días de germinadas. Cada tratamiento contó con tres repeticiones de 30 cápsulas cada una. Los resultados son la media de tres repeticiones.

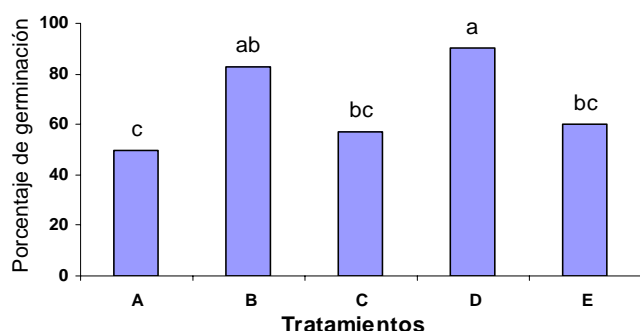
Evaluaciones realizadas:

- ⇒ porcentaje de cápsulas germinadas (10 días)
- ⇒ conteo y clasificación de plantas (35 días)
- ⇒ variables fisiológicas de las plantas: altura, número de hojas, largo de la hoja más desarrollada, número de raíces y largo de la raíz más desarrollada (cm).

*Procesamiento estadístico.* Para el procesamiento estadístico de los resultados se utilizaron las pruebas paramétricas (*OneWay ANOVA*) y no paramétricas (*Kruskal-Wallis* y *Student Newman Keuls*) y del paquete estadístico SPSS (Versión 8.0 para Windows). Los datos en porcentaje fueron transformados según la ecuación  $x' = 2 * \text{Arcsenv}(n/100)$ .

## RESULTADOS

El porcentaje de germinación de las cápsulas en los diferentes tratamientos se expone en la Figura 1.

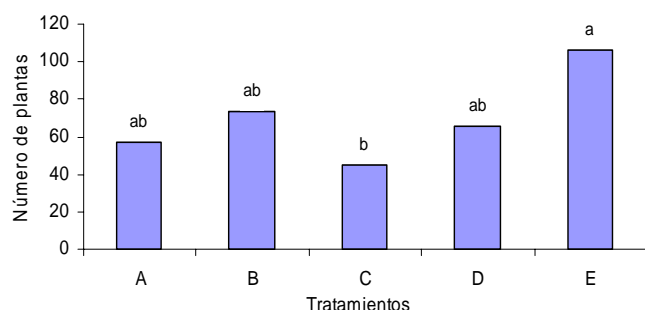


Los datos fueron transformados ( $x' = 2 \sqrt{\text{ARSEN}} (\sqrt{x/100})$ ) (Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según pruebas no paramétricas de *Kruskal-Wallis* y *Student Newman Keuls* para  $p < 0.05$ )

**Figura 1. Porcentaje de germinación de las cápsulas sometidas a diferentes tratamientos con Pectimorf: A) control; B) 10 mg.L<sup>-1</sup> +AIA +GA<sub>3</sub>; C) 10 mg.L<sup>-1</sup> +GA<sub>3</sub> -AIA; D) 10 mg.L<sup>-1</sup> -GA<sub>3</sub> +AIA; E) 10 mg.L<sup>-1</sup> -GA<sub>3</sub> -AIA**

Como se aprecia en la Figura 1, los mayores porcentajes de germinación de las cápsulas se obtuvieron en los tratamientos B (donde se combina el Pectimorf con AIA y GA<sub>3</sub>) y D (combinación con AIA y ausencia de GA<sub>3</sub>), sin diferencias estadísticas entre ellos, aunque este último no difiere del resto de los tratamientos. La combinación del Pectimorf en ausencia de AIA y solo fueron las que mostraron los menores porcentajes de embriones germinados, sin diferencias con el control.

En la Figura 2 se muestra la evaluación del número de plantas obtenidas en las diferentes combinaciones de Pectimorf adicionadas a las cápsulas.



Luego de transformados los datos ( $x' = \sqrt{vx}$ ). Se realizaron pruebas no paramétricas (*Kruskal-Wallis* y *Student Newman Keuls* para  $p < 0.05$ ) (Medias con letras desiguales difieren estadísticamente)

**Figura 2. Número de plantas en los diferentes tratamientos con Pectimorf: A) control; B) 10 mg.L<sup>-1</sup> +AIA +GA<sub>3</sub>; C) 10 mg.L<sup>-1</sup> +GA<sub>3</sub> -AIA; D) 10 mg.L<sup>-1</sup> -GA<sub>3</sub> +AIA; E) 10 mg.L<sup>-1</sup> -GA<sub>3</sub> -AIA**

Como se aprecia en la figura, el tratamiento que logró la mayor producción de plantas fue el E, donde se aplicó el Pectimorf solamente, aunque no presentó diferencias estadísticas con el control ni en las combinaciones con AIA y GA<sub>3</sub> (B) y AIA (D). Mientras que el tratamiento que mostró los menores valores fue la combinación de Pectimorf con GA<sub>3</sub> (C).

En la Tabla II se exponen los indicadores fisiológicos evaluados en las plantas obtenidas por semilla artificial.

**Tabla II. Comportamiento de las variables fisiológicas en las plantas obtenidas a partir de los diferentes tratamientos con Pectimorf. A) control; B) 10 mg.L<sup>-1</sup> + AIA + GA<sub>3</sub>; C) 10 mg.L<sup>-1</sup> + GA<sub>3</sub> - AIA; D) 10 mg.L<sup>-1</sup> + AIA -GA<sub>3</sub>; E) 10 mg.L<sup>-1</sup> -GA<sub>3</sub> -AIA**

Tratamientos	Altura de planta	No. hojas	Largo hoja	No. raíces	Largo raíz
A	1.48c	4.00cd	6.70b	1.30b	1.55cd
B	2.48 <sup>a</sup>	4.90 <sup>a</sup>	10.12 <sup>a</sup>	2.57 <sup>a</sup>	3.65 <sup>a</sup>
C	1.87b	4.27bc	5.47c	1.13b	2.89b
D	2.70 <sup>a</sup>	4.42b	6.04bc	1.16b	1.25d
E	1.69bc	3.76d	5.24c	2.84a	2.10c

Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según pruebas no paramétricas (*Kruskal-Wallis* y *Student Newman Keuls*) para  $p < 0.05$ )

Como se aprecia en la tabla, el tratamiento que mostró el mejor comportamiento en todas las variables evaluadas, fue la combinación donde se aplicó el Pectimorf con las dos hormonas que componen el medio del endospermo artificial (AIA y GA<sub>3</sub>), con diferencias estadísticas de significación. En todos los tratamientos donde se aplicó la mezcla de oligosacáridos se incrementó la talla de las plantas, aunque donde este se aplicó solo (E) no hubo diferencias estadísticas con el control. De igual modo, este tratamiento incrementó significativamente el número de raíces emitidas por planta. Es interesante señalar que el Pectimorf aplicado solo (tratamiento E) produjo un mayor número de plantas (Figura 2), pero de menor talla, con hojas más pequeñas y en menor número.

## DISCUSIÓN

Los oligosacáridos interactúan con los sitios de enlace de las auxinas en la membrana celular (12). Este descubrimiento no solo apoya la hipótesis del efecto antiauxínico, sino que además sugiere que los oligogalacturonidos actúan a nivel de la membrana.

Los estudios llevados a cabo hasta la fecha con Pectimorf y que aparecen reflejados en la literatura, se relacionan con la formación de callo y el enraizamiento de tejidos. En el cultivo de papa, *Solanum tuberosum*, la combinación de AIA con Pectimorf (0.1 y 3.2 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente) no presentó diferencias significativas en la diferenciación del tejido y formación de embriones (13), a diferencia de lo publicado en el mismo cultivo al combinar Zeatina con Pectimorf (0.5 y 3.2 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente), donde sí se encontró efecto positivo sobre la formación de embriones somáticos. Efectos similares fueron encontrados en el cultivo de *Anthurium cubense* (4), al utilizar concentraciones de Pectimorf establecidas dentro del rango de 2 a 4 mg.L<sup>-1</sup>. Por otra parte, en un estudio realizado en *Solanum tuberosum* (5), se demostró que no existe un efecto del biorregulador en la forma-

ción de callo al ser usado como sustituto del 2,4-D en las dosis de 1 y 10 mg.L<sup>-1</sup>; en este caso el Pectimorf no logró estimular los niveles endógenos de la auxina necesarios para los procesos de división celular. En café, no se encontró respuesta positiva en la formación de callos embriogénicos (3) al ser empleado el Pectimorf como sustituto del 2,4-D, lo cual puso de manifiesto el requerimiento de la auxina para que este ejerza su acción reguladora.

En caña de azúcar, en la fase de inducción e histodiferenciación de callos, no se encontró un resultado directamente asociado con un efecto antiauxínico (10), al tener en cuenta que el mayor número de embriones y la mayor sincronía ocurrió en aquellas combinaciones en las cuales el 2,4-D estaba reducido, fundamentalmente en la concentración de 5.0 mg.L<sup>-1</sup> del oligosacárido. Mientras que, en la formación de masa fresca de los callos, las concentraciones mayores de 2,4-D mostraron incrementos en la medida que se incrementó el Pectimorf, lo que se asoció a un efecto sinérgico con la auxina. En el trabajo que se presenta no se evaluó el Pectimorf en el proceso embriogénico, sino en el desarrollo de los embriones somáticos, luego de encapsulados en perlas de alginato para formar la semilla artificial y aunque se encontró influencia del producto en el número de plantas, cuando se aplicó solo, el desarrollo de ellas no fue adecuado, lo que hace pensar que no puede actuar como un estimulante aislado y que su acción sí puede potenciar la actividad de otras hormonas de crecimiento, como es el caso del AIA y el GA<sub>3</sub> en el endospermo artificial. Sin la acción conjunta de otros reguladores del crecimiento, hubo un detrimento de la calidad de las plantas, pues la talla, el número de hojas y la longitud de estas disminuyó significativamente. Es de señalar, además, que en el momento de la evaluación final, estas cápsulas presentaban un elevado número de plantas deformadas que no fue posible evaluar.

El efecto más pronunciado en los resultados obtenidos en el trabajo ponen de manifiesto, además, un efecto sinérgico del Pectimorf con el AIA, lo que se observa en el incremento del porcentaje de germinación de las cápsulas, que se vio favorecido significativamente en los tratamientos donde ambos se encontraban presentes, mientras que no se encontró similar reacción en la interacción del oligosacárido con la giberelina.

Aunque es controversial el modo de acción de este oligosacárido y se ha encontrado en algunos cultivos un efecto contrario a las auxinas, tanto en la fase de inducción e histodiferenciación de callos (5) como en la semilla artificial de caña de azúcar, el Pectimorf manifiesta su modo de acción en interacción con las auxinas, lo que sugiere su aplicación como potenciador de este regulador del crecimiento ampliamente empleado en la embriogénesis somática de numerosos cultivos.

## REFERENCIAS

1. Cabrera, J. C.; Iglesias, R.; González, S.; Diosdado, E.; Gómez, R.; Izquierdo, H.; Rodríguez, T.; Cevallos, M. y Falcón, A. Aportes al conocimiento de la función de los fragmentos pécticos en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Evaluación de sus posibilidades biotecnológicas. Simposio Internacional de Biotecnología de las Plantas. En: Seminario Científico (6:2000: La Habana), 2000. p. 17.
2. Cabrera, J. C.; Iglesias, R.; Gutiérrez, A.; González, S.; Diosdado, E.; Garbey, P.; Gómez, R.; Agramonte, D.; Izquierdo, H. y González, J. Pectimorf: un biorregulador cubano para la biotecnología vegetal. En: Seminario Científico (11:1998:La Habana). 1998. p. 133.
3. Cevallos, M. Embriogénesis somática en el cultivo del caféto (*Coffea spp.*). Determinación de marcadores morfo-histológicos y moleculares. [Tesis de Doctorado], INCA, 2000. 131 p.
4. Montes, S.; Aldaz, J.; Caballs, M.; Cabrera, J. y López, M. Uso del biorregulador Pectimorf, en la propagación acelerada del *Anthurium Cubense*. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 3, p. 29-31.
5. Moré, O. y González, M. Empleo del oligopectato Pectimorf sobre el desarrollo de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum*, L.). La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2002.
6. Nieves, N.; Tapia, R.; Zambrano, Y.; Cid, M.; Pina, D. y Castillo, R. Field performance of sugarcane plants obtained from artificial seed in Cuba. *Sugarcane International*, 2003, no. 11-12, p. 23-25.
7. Nieves, N.; Zambrano, Y.; Tapia, R.; Cid, M.; Pina, D. y Castillo, R. Field performance of artificial seed-derived sugarcane plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, vol. 75, no. 3, p. 279-282.
8. Poblete, A. Evaluación del Pectimorf como complemento del 2,4-D en el proceso de calogénesis y sincronía en la embriogénesis somática de caña de azúcar. Tesis de Diplomado; Centro de Bioplasmas, 2003.
9. Tapia, R.; Castillo, R.; Nieves, N.; Blanco, M. A.; González, J.; Sánchez, M. y Rodríguez, Y. Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) var CP52-43. *Biotecnología Aplicada*, 1999, vol. 16, no. 1, p. 20-23.
10. Nieves, N.; Lorenzo, J. C.; Blanco, M. A.; González, J. L.; Peralta, H.; Hernández, M.; Santos, R.; Concepción, O.; Borroto, E.; Borroto, C. G.; Tapia, R.; Martínez, M. y Fundora, Z. Artificial endosperm by zygotic embryos of Cleopatra tangerine (*Citrus reshni* Hort ex Tan). A model by somatic embryos emcapsulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, vol. 54, no. 2, p. 77-83.
11. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
12. Coté, F. y Hahn, M. Los derivados de las oligosacarinas y su uso en la agricultura. *Plantarum Agric.*, 1994, vol. 13, no. 3, p. 16-19.
13. Hidrobo, J. Caracterización morfo-histológica y bioquímica del proceso de embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum* L.), utilización de biopreparados cubanos de producción comercial. Tesis; Universidad Agraria de La Habana, 2002.

Recibido: 27 de abril de 2005

Aceptado: 13 de diciembre de 2005