



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas

**Efecto de PectiMorf® en la propagación *in vitro*
de la yuca (*Manihot esculenta* C.), cultivares 'CMC-40'
y 'Señorita'**

Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Ing. Lorenzo Suárez Guerra. M.Sc.

Tutor: Dra. C. Ma. Margarita Hernández Espinosa

Consultante: Dr. C. Felice Cervone



Mayabeque

2016



FRASE

Prométeme que conservarás tu alegría de vivir, tu entusiasmo,
tu gracia y tu sensatez. Que no perderás tu disparate ni tu originalidad.

Prométeme que jamás dejarás de creer
en los ángeles, en la suerte, en los sueños
y en el poder de la mente.

Enriqueta Naón Roca



DEDICATORIA

- ✓ *A mi hija, la eterna bella Lorena y mi esposa, la mágica Sonia*
- ✓ *A mis padres: mi eterna novia Kacha y el innovador Lorenzo*
- ✓ *A la memoria de mis abuelos, el protector Rogelio y el guajiro Marcelino*
- ✓ *A mi querida abuela, la legendaria Magdalena*
- ✓ *A las personas que me quieren y hacen de mí, una mejor persona*
- ✓ *A la Ciencia cubana, por su contribución a mi desarrollo profesional*



AGRADECIMIENTOS

Llegue mis sinceros agradecimientos a los doctores Felice Cervone y Ma Margarita Hernández por su amistad, por su ayuda valiosa, por su comprensión, por su paciencia y por las experiencias comunicadas durante la tutoría de estas investigaciones.

Al colectivo del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas y en especial a los trabajadores del Departamento de Genética, por sus preocupaciones y ayuda desinteresada en todos los niveles por los que transitó el documento de tesis, así como a mis colegas y amigos por el apoyo brindado.

A la Facultad de Agronomía y Facultad de Biología, por contribuir a mi desarrollo profesional: esos espectaculares profesores y profesoras, algunos por ley de la vida ya no están entre nosotros físicamente y los otros, saben que estarán en mi mente y corazón, mi gratitud eterna

Finalmente, agradecer a mi familia por la paciencia de estos años y las horas de ausencia para materializar esta tesis. Muchos besos y abrazos.

A todos, muchísimas gracias.

Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

Suárez-Guerra, L. Efecto de PectiMorf® en la propagación in vitro de la yuca (Manihot esculenta C.), cultivares 'CMC-40' y 'Señorita' [Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas] Mayabeque: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2016

Según Sistema de Referencia Apellido, año

Suárez-Guerra, L. 2016. Efecto de PectiMorf® en la propagación in vitro de la yuca (Manihot esculenta C.), cultivares 'CMC-40' y 'Señorita' [Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas] Mayabeque: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.



SÍNTESIS

SÍNTESIS

La baja disponibilidad de semilla de alta calidad de yuca (*Manihot esculenta* C.) para los agricultores cubanos, pudiera solucionarse mediante la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*. Por lo que, una de las alternativas para resolver el problema podría ser el desarrollo de metodologías más eficientes y sostenibles para la obtención de material *in vitro*, para garantizar el mejoramiento de la calidad de la semilla y el saneamiento del material vegetal. Se trazó como objetivo, estudiar la actividad biológica de un producto cubano (Pectimorf®), empleando *Arabidopsis thaliana* como modelo y validar su efecto en las diferentes fases del protocolo de micropropagación de la yuca, cultivares 'CMC-40' y 'Señorita', como complemento o sustituto de los reguladores del crecimiento empleados tradicionalmente en el medio de cultivo y así sustituir importaciones. Se determinó mediante estudios histológicos, citogenéticos, isoenzimáticos y moleculares (RAPD) el efecto de Pectimorf® sobre el material obtenido. Se informa para la ciencia que Pectimorf® ejerció una acción inhibitoria sobre los genes *SAUR-16* e *IAA-5*, que codifican la expresión de auxinas en plantas de *Arabidopsis*, corroborando lo informado para otros oligopeptatos. En los cultivares de yuca estudiados, para el crecimiento de ápices el empleo del producto a la concentración de 5 mg L⁻¹ en sustitución de ANA en los medios de cultivos brindó resultados similares al tratamiento control. En la fase de multiplicación de yemas axilares, el empleo de Pectimorf® a 10 mg L⁻¹, resultó adecuado, obteniéndose resultados superiores al medio control con 0,01 mg L⁻¹ de ANA. Se comprobó un efecto residual sobre las vitroplantas, el cual se manifestó por un aumento en la tasa de crecimiento, altura, contenido de masa fresca y masa seca, así como algunos cambios en la anatomía de las hojas, que provocaron un mayor porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatización (superior al 90 %). Se demostró mediante los análisis realizados que Pectimorf® no produjo cambios en las características de las plantas micropropagadas. Los resultados permitieron proponer un protocolo para la micropropagación de los cultivares de yuca 'CMC-40' y 'Señorita'.



ÍNDICE

Índice

1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Generalidades del cultivo de la yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	5
2.1.1 Taxonomía y Origen	5
2.1.2 Importancia económica	6
2.2 Cultivares comerciales en Cuba	8
2.3 Formas de propagación	9
2.4 El Cultivo de tejidos	9
2.4.1 Aplicaciones	10
2.4.2 Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en yuca	10
2.5 Medios de cultivo	11
2.5.1 Composición del medio de cultivo	12
2.6 Otras sustancias empleadas como reguladores del crecimiento	22
2.6.1 Biopreparados bacterianos	22
2.6.2 Liplant y Biostan	23
2.6.3 Fitomás E	23
2.6.4 Oligosacarinas	24
2.7 Empleo del Pectimorf [®] en el cultivo de tejidos vegetales	28
2.8 Marcadores empleados en el estudio de la variabilidad genética	31
3 MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 Evaluación de la interacción auxina/Pectimorf [®]	36
3.2 Efecto de Pectimorf [®] sobre las diferentes fases de la micropropagación de la yuca	38
3.2.1 Crecimiento de ápices in vitro	38
3.2.2 Crecimiento de yemas axilares de segmentos nodales	40
3.2.3 Número de subcultivos de yemas axilares	41
3.2.4 Aclimatización de las vitroplantas	42
3.3 Efecto de Pectimorf [®] sobre la morfología y características genéticas de las plantas de yuca obtenidas por micropropagación	43
3.3.1 Anatomía foliar y de las raíces de las plantas obtenidas	43

3.3.2 Determinación del número cromosómico en ápices radiculares de plantas micropropagadas	45
3.3.3 Estudios isoenzimáticos del material micropropagado	46
3.3.4 Análisis de marcadores RADPs en plantas micropropagadas	47
4 RESULTADOS Y DISCUSION	49
4.1 Evaluación de la interacción auxina/Pectimorf [®]	49
4.2 Efecto de Pectimorf [®] sobre las diferentes fases de la micropropagación de la yuca	53
4.2.1 Crecimiento de ápices in vitro	53
4.2.2 Crecimiento de yemas axilares de segmentos nodales	59
4.2.3 Número de subcultivos de yemas axilares.	66
4.2.4 Aclimatización de vitroplantas	70
4.3 Estudios sobre la morfología y características genéticas de plantas de yuca obtenidas por micropropagación	75
4.3.1 Anatomía foliar y de las raíces de las plantas obtenidas	75
4.3.2 Número cromosómico en ápices radiculares de plantas	83
4.3.3 Estudios isoenzimáticos del material propagado	84
4.3.4 Análisis de marcadores RADP en plantas micropropagadas de yuca	90
5 CONCLUSIONES	95
6 RECOMENDACIONES	96
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8 ANEXOS	



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

La falta de tecnologías para la producción de material de plantación, en cantidad suficiente y con condiciones fitosanitarias óptimas, se ha convertido en un obstáculo para el desarrollo a escala comercial de los cultivos de reproducción agámica (Rodríguez, 2015). La propagación vegetativa convencional favorece la diseminación de plagas, lo cual afecta el volumen y la calidad del material de plantación y el rendimiento en dichos cultivos.

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz), constituye el cuarto producto alimenticio en importancia, en lo referente a cantidad de calorías producidas, después del arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y maíz (*Zea mays* L.) y forma parte de la dieta de más de 1 000 millones de personas (Ruíz *et al.*, 2010).

En Cuba, es un valioso alimento desde la época de los aborígenes y componente importante en la dieta tradicional básica de la población; además se emplea en la alimentación de cerdos y aves y como banco de proteínas, fundamentalmente para la ganadería (Medero, 2006).

La aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* es una alternativa de gran utilidad para la producción de semilla agámica básica a gran escala. Según plantean algunos autores (Solís *et al.*, 2011; Demeke *et al.*, 2014; Hine *et al.*, 2014), estas técnicas permiten recuperar el vigor y la productividad de las plantas y, a su vez, contribuyen a la producción de grandes volúmenes de material de siembra de alta calidad fisiológica (Posada, 2016). También, permiten la propagación de plantas libres de virus y de cualquier otro patógeno (Albarrán *et al.*, 2011).

Sin embargo, los costos de los protocolos de micropropagación son relativamente altos, porque resultan exigentes en cuanto a la composición del medio de cultivo especialmente, en lo referente al empleo de reguladores del crecimiento. En este sentido, resulta importante modificar los protocolos de regeneración de plantas de yuca mediante el cultivo *in vitro* de tejidos, ya sea por embriogénesis somática (Medina *et al.*, 2003; Medero, 2006; Ochoa *et al.*, 2012) u organogénesis (Li *et al.*, 1998; Medero *et al.*, 2001; Dawit, 2009; Mapayi *et al.*, 2013), mediante la introducción de productos bioactivos de producción nacional, como alternativa para mejorar la eficiencia económica del proceso (Hernández *et al.*, 2009).

Pectimorf[®], es considerado un regulador del crecimiento no tradicional y se produce en Cuba a partir de degradaciones enzimáticas parciales de las paredes celulares de cortezas de frutos cítricos (Cabrera *et al.*, 2003). Este producto, se ha empleado como sustituto de hormonas tradicionales en protocolos de micropropagación, porque estimula el crecimiento y diferenciación en cultivos como el tomate (*Solanum lycopersicon* L.) (Plana *et al.*, 2003), caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.) (Nieves *et al.*, 2006), malanga (*Colocasia* sp.) (Hernández *et al.*, 2009) y plátanos (*Musa* ssp.) (Izquierdo, 2013). También es considerado un potente elicitador de defensa en plantas (Suárez *et al.*, 2013).

Uno de los problemas de la aplicación del cultivo de tejidos, es la variabilidad generada por la técnica de propagación *in vitro* empleada, aspecto que con el desarrollo de los marcadores citológicos, isoenzimáticos y moleculares ha posibilitado detectar cambios genéticos (Posada, 2016).

Teniendo en cuenta la problemática señalada anteriormente, se consideró importante estudiar el efecto de Pectimorf[®] sobre la expresión de los genes *IAA-5* y *SAUR-16* que codifican para las auxinas en plantas (Savatin *et al.*, 2011), así como validar su efecto en las diferentes fases del protocolo de micropropagación *in vitro* de la yuca, con vistas a optimizar este proceso para la obtención de semilla agámica de calidad en las biofábricas y el fomento de bancos de semilla élite para ser utilizadas en la producción, y contribuir así, a la elevación de los rendimientos de este cultivo en el país.

Es por ello que, a partir de los resultados del empleo de Pectimorf[®] en diferentes cultivos, se propuso el siguiente **Problema Científico**: “¿Es posible emplear Pectimorf[®] en sustitución o como complemento de reguladores del crecimiento tradicionales en el protocolo de micropropagación de yuca (*Manihot esculenta* C.) para la obtención de vitroplantas vigorosas e idénticas al material de partida?

Para ello se planteó la siguiente **Hipótesis** de trabajo: El empleo de Pectimorf[®] en las diferentes fases de la micropropagación de los cultivares de yuca (*Manihot esculenta* C.), ‘CMC-40’ y ‘Señorita’, en sustitución o como complemento de reguladores en los medios de cultivo, permite la obtención de vitroplantas vigorosas y genéticamente estables.

Para dar respuesta a esta hipótesis se planteó el siguiente **Objetivo General**: Demostrar la posibilidad del uso de Pectimorf[®] en el protocolo para la micropropagación de la yuca, en sustitución o como complemento de reguladores del crecimiento tradicionales empleados en el mismo, para la obtención de plantas vigorosas sin afectar la estabilidad del material obtenido.

Los **Objetivos Específicos** propuestos fueron los siguientes:

- Comprobar, a través del modelo biológico internacionalmente establecido, el posible antagonismo entre la acción de los oligopectatos y las auxinas.
- Determinar el efecto de Pectimorf[®], como complemento o sustituto de los reguladores empleados en los medios de cultivo, en las diferentes fases de la propagación *in vitro* de la yuca, cultivares 'CMC-40' y 'Señorita'.
- Determinar el efecto de Pectimorf[®] sobre la estabilidad genética del material obtenido por micropropagación.

Novedad Científica

- Se informa para la ciencia, la acción de Pectimorf[®] sobre la expresión de los niveles de transcripción de los genes *IAA-5* y *SAUR-16*, empleando como modelo *A. thaliana* (cv. Columbia O), en presencia de ácido indolacético (AIA).
- Se señala por primera vez, el efecto que ejerce Pectimorf[®], en las diferentes fases de la propagación *in vitro* de la yuca, cultivares 'CMC-40' y 'Señorita'.
- Se indica que Pectimorf[®] posee un efecto residual, que favorece la aclimatización de las plantas, al conferirles mayor tasa de crecimiento, altura, contenido de masa fresca y masa seca y modificaciones en el tamaño de los estomas.

Importancia teórica

- Se demuestra que Pectimorf[®] ejerce una acción inhibitoria sobre la expresión de los niveles de transcripción de los genes *IAA-5* y *SAUR-16* que son inducidos tempranamente por auxinas en la planta modelo *A. thaliana*, lo cual evidencia que su acción sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas se ejerce independientemente de ellos.

- Se revela que Pectimorf[®] no produjo cambios en el nivel de ploidía, la anatomía de las plantas ni a nivel bioquímico y molecular en el material vegetal obtenido por micropropagación.

Importancia práctica

- Se ofrece una metodología para la micropropagación de los cultivares de yuca, 'CMC-40' y 'Señorita', con el empleo de Pectimorf[®], en los medios de cultivo, la cual podría emplearse en los laboratorios de propagación comercial masiva (biofabricas), con el consiguiente impacto en la sustitución de importaciones de los reguladores empleados actualmente en Cuba.



CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades del cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

2.1.1 Taxonomía y Origen

La yuca pertenece al reino Vegetal, división *Spermatophyta*, subdivisión *Angiospermae* y a la clase *Dicotyledoneae*. Se encuentra ubicada en el orden *Euphorbiales*, familia *Euphorbiaceae*, tribu *Manihotae* a la que pertenece el género *Manihot*.

La familia *Euphorbiaceae*, constituida por unas 2 700 especies, se caracteriza por un notable desarrollo de los vasos laticíferos, compuesto por células secretoras llamadas galactocitos y éstos producen la secreción lechosa que caracterizan a las plantas que la representan. También constituyen a esta familia numerosas malezas, plantas ornamentales y otras de valor medicinal. Un género muy importante de esta familia lo constituye *Manihot*, el cual solo se encuentra en las Américas. Se han descrito alrededor de 98 especies asignadas a este género, de las que solo la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) tiene relevancia económica y es cultivada.

El nombre científico de la yuca, fue pronunciado originalmente por Crantz, en 1766. Posteriormente, fue clasificada por Pohl en 1827 y Pax en 1910 como dos especies diferentes, dependiendo si se trataba de yuca amarga (*M. utilissima*) o dulce (*M. aipi*). Finalmente Allem (1995) propuso que la especie *M. esculenta* fuera dividida en tres subespecies: *M. esculenta*, *M. flavellifolia* y *M. peruviana*, el cual sugirió que estas dos últimas subespecies son formas silvestres de la versión cultivada *M. esculenta* subespecie *esculenta*.

Acerca del origen de la yuca, la más antigua y hasta ahora más sostenida hipótesis se le atribuye al botánico y geógrafo de plantas De Candolle alrededor de 1967, quien basado en la abundancia de especies silvestres en la parte norte- oeste del Brasil y que muestran la antigüedad del cultivo de la yuca en dicha región, propuso que ésta fue primeramente cultivada allí. Numerosas evidencias apuntan a que el área de domesticación de la yuca comprende una vasta región desde México hasta Brasil. Esta especie pudo cultivarse desde hace 5 000 años (Simmonds, 1976).

La yuca podría ubicarse en una categoría que Harlan en 1971, cita Hershey y Amaya (1983), llama cultivos “no-céntricos”, es decir, aquellos que parecen no tener un centro de origen ni de diversidad y que pudo domesticarse en un área muy amplia.

2.1.2 Importancia económica

En el mundo, la yuca es el cuarto producto alimenticio básico en importancia, en lo referente a cantidad de calorías producidas, después del arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y maíz (*Zea mays* L.) y forma parte de la dieta de más de 1 000 millones de personas (Ruíz *et al.*, 2010).

La yuca, catalogada como la más importante en el género de raíces, rizomas y tubérculos tropicales, tiene su principal valor económico en su órgano de reserva o almacenamiento de energía, las raíces, éste tiene diversos usos en la alimentación humana y animal, aunque su follaje se aprovecha para la alimentación animal en algunas zonas rurales y en África, se utiliza como verdura fresca para consumo humano (ELTIEMPO, 2014).

Este producto se comercializa como raíz fresca y procesada para consumo humano, como insumo en la industria alimenticia, como materia prima en la industria productora de alimentos balanceados para animales y como producto intermedio en la industria no alimenticia (AGRO2, 2014). En la tabla 1, se observa el alto valor nutricional de la yuca, en la composición química de la harina de raíces en base a masa seca.

Tabla 1. Composición química de la harina de yuca (*Manihot esculenta* C.) de la raíz completa y de la raíz sin cáscara (base seca).

Componentes	Contenidos (%)	
	Raíz con cáscara	Raíz sin cáscara
Materia seca	100,00	100,00
Carbohidratos disponibles	83,80	92,40
Proteína cruda	3,05	1,56
Ceniza	2,45	2,00
Hemicelulosa	1,16	1,45
Extracto	1,04	0,88

Fuente: Ceballos (2002)

Las hojas al igual que las raíces, tienen importantes usos. En el continente africano, estas son procesadas y utilizadas en el consumo humano, estas tienen gran valor nutricional (Tabla 2) y altos niveles de proteína (18- 22%) (Buitrago, 1990).

Tabla 2. Concentración de elementos minerales en hojas y raíces de yuca.

Elemento	Concentración promedio en hojas (mg/100g masa seca)	Concentración promedio en raíces (mg/100g masa seca)
Fe	94,4	9,6
Mn	67,9	1,2
B	66,1	2,4
Cu	7,3	2,2
Zn	51,6	6,4
Ca	12 324	590
Mg	7 198	1 153
Na	11,4	66,4
K	10 109	8 903
P	3 071	1 284
S	2 714	273

Fuente: Ceballos y Cruz (2002)

El producto industrial más importante elaborado con base en yuca es el almidón, que se usa en las industrias alimenticia y textil y en la fabricación de papeles y adhesivos, aunque también tiene potencial en la producción de dextrosa y otros derivados (Cocinayvino, 2014).

En Cuba esta raíz rústica, no solo es un alimento básico para muchas familias campesinas de escasos recursos, constituye un valioso alimento desde la época de los aborígenes, mucho antes de la llegada de los colonizadores españoles (Medero, 2006). Constituye un componente importante en la dieta tradicional de la población. Su follaje se emplea en bancos de proteína para la ganadería vacuna y como sustituto en la confección de concentrados para la alimentación de cerdos y aves.

Su importancia se debe ampliar con su potencialidad como materia prima en la producción de etanol y, en ese sentido, en Tailandia hay un fuerte incremento de la producción de etanol a partir de yuca (Nguyent *et al.*, 2007), podría ser la disminución de los costos de producción un elemento importante para la competitividad de este biocombustible.

Adicionalmente, la yuca tiene una alta tolerancia a la sequía, capacidad de producción en suelos ácidos y degradados típicos de algunas regiones de países tropicales y la resistencia a diversas plagas (Cadavid, 2005). Por las razones antes expuestas, este cultivo se convertirá en los próximos años, en la reina de las viandas, en todo el mundo.

En Cuba, es de gran interés el desarrollo en conocimiento sobre el cultivo, de genotipos más productivos y mejor adaptados a las condiciones que imponen el cambio climático y las nuevas exigencias del mercado del siglo XXI (Beovides *et al.*, 2014).

2.2 Cultivares comerciales en Cuba

Dentro de la estrategia varietal nacional para el cultivo de la yuca, definida por el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), se encuentran los cultivares siguientes: 'Señorita', 'CMC-40', 'CEMSA 74-725', 'CEMSA 74-6329' e 'INIVIT Y93-4'. Según encuestas realizadas a productores del occidente cubano (Hernández, 2004), 'CMC-40' y 'Señorita' fueron los de mayor aceptación por los agricultores de la zona.

Características del cultivar 'CMC-40'

Plantas de 1,5-2,5 m de altura, con más de dos ramificaciones, de porte semi-erecto, tallos de color marrón oscuro, hojas 5-7 lóbulos, follaje joven verde-rojizo, pecíolos rojos, hojas adultas verdes, hojas jóvenes rosadas, lóbulos simples, pecíolos inclinados hacia arriba, de forma irregular, posee más de 10 raíces por planta, de superficie rugosa y crecimiento oblícuo, sésiles, cónicas o cilíndricas, de color castaño oscuro la película externa, corteza rosada y pulpa blanca. Dentro de sus principales características se destacan su alta productividad y ciclo corto (6-10 meses) (INIVIT, 2004).

Características del cultivar 'Señorita'

Tallo verde amarillo, con yemas de color amarillo-rosado, hojas verdes con los nervios y pecíolos ligeramente rosados en adultas, en hojas jóvenes los pecíolos son rojos por la parte superior y verde-rojo por la parte inferior. Plantas de porte erecto, no ramificada o poco ramificada. Tallo muy vigoroso y de entrenudos cortos. Posee raíces cortas y de color blanco, cada planta produce un promedio de 8-12, bastante

superficiales, lo cual facilita la cosecha. El ciclo es largo, más de 10 meses. En este cultivar se destaca su excelente calidad culinaria.

2.3 Formas de propagación

Los agricultores reproducen el cultivo de la yuca mediante la propagación vegetativa, utilizando semillas asexuales (estacas o pedazos de tallos) en siembras repetidas, lo que constituye un riesgo, ya que es posible diseminar enfermedades fitopatógenas (Albarrán, 2003), constituyendo una de las principales limitantes en los rendimientos y la expansión del cultivo (Mantilla, 1996).

Se puede propagar también de forma sexual, a partir de la semilla botánica, pero ésta tiene el inconveniente de la segregación, ya que esta especie es alógama y por tanto, heterocigótica (Ceballos y Cruz, 2002).

Otra vía de propagación la constituye la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* o propagación clonal *in vitro*, la cual es motivo de frecuentes estudios y se han alcanzado logros en la micropropagación (Roca *et al.*, 1991; Fregene *et al.*, 2002). La siembra de meristemos de yuca ofrece múltiples ventajas, entre ellas, se recupera el vigor y la productividad de las plantas y a su vez, contribuye a la producción de propágulos de alta calidad libres de virus y de cualquier otro patógeno (Mederos *et al.*, 2000; Albarrán, 2003).

Las técnicas de cultivo *in vitro*, se basan en el aislamiento de una porción de tejido de la planta, la cual es cultivada bajo condiciones asépticas, en un medio de cultivo de composición definida. De forma general, existen varias vías para realizar la propagación clonal *in vitro*, entre estas se encuentran el cultivo de meristemos, ápices o yemas axilares y embriones sexuales, la organogénesis y la embriogénesis somática (Perea, 1993; Bull *et al.*, 2009; Ochoa *et al.*, 2012; Mayapi *et al.*, 2013).

2.4 El Cultivo de tejidos

Los primeros intentos de cultivo de células fueron realizados por Haberlandt en 1902, quien postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro* (Jiménez, 1998). Haberlandt enfatizó el concepto de totipotencia celular, el de hormonas de crecimiento y de callo, a este último lo define como una masa amorfa de células y predijo la posibilidad de

que algún día se pudieran cultivar embriones artificiales provenientes de células vegetativas (Pierick, 1991).

El cultivo de tejidos puede definirse como el conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos, a emplear en los medios nutritivos artificiales. Las etapas principales en el desarrollo del cultivo de tejidos según Pérez (1998) son:

- 1890- 1930 Primeros intentos para cultivar células en condiciones asépticas. Formulación de los problemas a resolver para lograr que las células aisladas provocaran división celular.
- 1930- 1955 Cultivo de células, tejidos y órganos.
- 1950- 1960 Morfogénesis *in vitro*.
- 1960- 1970 Propagación *in vitro*.
- 1970- 1980 Trabajos con protoplastos de células vegetales.
- 1980- 1990 Variación somaclonal, genética de las células somáticas.
- 1990- 2000 Hibridación somática, semilla artificial, transformación genética, cultivo de anteras, marcadores moleculares, ingeniería genética.
- 2000- actualidad. Desarrollo de la Biología Molecular, Genómica y Proteómica.

2.4.1 Aplicaciones

El cultivo de tejidos vegetales presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas, tales como: mejora genética, multiplicación vegetativa (micropropagación), obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, obtención de haploides y líneas isogénicas, conservación de germoplasma, crioconservación, cultivo de células y protoplastos, variación somaclonal, embriogénesis somática, ingeniería genética, marcadores moleculares y otros (Villalobos y Thorpe, 1991; Beltrán *et al.*, 2010).

2.4.2 Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en yuca

Las técnicas de cultivo de tejidos en yuca, se emplean para la conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Beltrán, 1984), saneamiento de cultivares

(Roca *et al.*, 1991), y para la crioconservación y mejoramiento genético de genotipos de gran importancia económica (Escobar *et al.*, 2004).

Roca (1984), planteó que la vía más frecuente para la micropropagación de la yuca es el cultivo de ápices y segmentos del tallo. En estudios sobre el desarrollo de callos, se demostró que el empleo de auxinas y citoquininas en los medios de cultivo son necesarias para el crecimiento y formación de raíces (Noerhadi y Widiyanto, 1982). Li *et al.*, (1995), observaron la regeneración de brotes a partir de cotiledones de embriones somáticos germinados, al añadir en el medio de cultivo la 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indolbutírico (AIB).

El primer trabajo sobre embriogénesis somática en yuca se realizó por Stamp y Henshawn (1982), a consecuencia se evaluaron distintos tipos de explantes y auxinas sintéticas en diferentes concentraciones (Medero *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2003; Feitosa *et al.*, 2007), los cuales demostraron que los meristemas axilares y apicales son capaces de producir eficientemente embriones somáticos (Medero *et al.*, 2000), también se determinó que las auxinas sintéticas Picloram y Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) son eficientes para la inducción de embriones somáticos. Sin embargo se encontraron cultivares específicos en los cuales solo se inducen embriones somáticos con auxinas diferentes como Dicamba (Ácido 3,6-Dicloro-o-anísico) (Medina *et al.*, 2003).

En la actualidad, aún se continua investigando el papel de los reguladores del crecimiento y las características físicas de los medios de cultivo, en aras de establecer nuevos protocolos de propagación *in vitro* de yuca, ya sea por embriogénesis somática o vía organogénesis, con el fin de obtener metodologías que estandaricen cultivares recalcitrantes y de alto valor agronómico (Ochoa *et al.*, 2012, Mayapi *et al.*, 2013). Por las razones mencionadas, se hace necesario trabajar en mejorar los protocolos de propagación *in vitro* y ampliar el número de cultivares que respaldan a esta forma de propagación.

2.5 Medios de cultivo

Los principales componentes nutricionales del medio de cultivo para el crecimiento ilimitado de células, tejidos u órganos fue establecido en los últimos 40 años, gracias a los aportes de numerosos investigadores. Mediante el medio de cultivo sintético se

le debe proporcionar al explante (células, tejidos u órganos) los requerimientos nutricionales esenciales (sales inorgánicas, reguladores del crecimiento, vitaminas, fuentes de carbono y aminoácidos) en la proporción y dosis específicas para cada especie y tipo de tejido (Alvarenga, 2007).

Cuando se va a establecer un cultivo por primera vez, el procedimiento usual consiste en probar un medio previamente estudiado y que podría modificarse al nuevo material vegetal. Alternativamente, puede probarse un medio de composición relativamente simple, al cual se van a adicionar otros componentes nutritivos complejos. Generalmente, la complejidad del medio aumenta a medida que disminuye el tamaño del explante a cultivar.

Existe un total de 260 medios de cultivos publicados y muchas revisiones acerca de ellos así como de su composición; estos difieren esencialmente por su composición general de sales.

El medio Murashige y Skoog (1962) es, sin lugar a dudas, el que más se emplea cuando se trata de organogénesis (Perez-Tornero, Tallon y Porras, 2010; Babak, Ahmad y Masoud, 2013; Sutan, Popescu e Isac, 2010; Elektra, Bari y Petrit, 2013) el cual tiene la peculiaridad de ser un medio rico en sales. Otros medios como el medio de Vacin Went (1949) o medio Knudson (1946), poseen una baja composición de sales. Actualmente, numerosos autores emplean en los medios de cultivos componentes orgánicos (Asghar *et al.*, 2011; Salazar y Cancino, 2012) con el objetivo de mejorar la eficiencia del requerimiento nutricional de los cultivos micropropagados.

2.5.1 Composición del medio de cultivo

De forma general, los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes compuestos:

2.5.1.1 Sales inorgánicas

a) Macroelementos: También se denominan macronutrientes o elementos mayores. Juegan un rol importante en la vida de las plantas y son requeridos en mayores cantidades. Ellos son: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg) y azufre (S).

b) Microelementos: Son componentes de la célula de la planta, resultan importantes para su metabolismo y fisiología y se emplean en pequeñas cantidades. Estos son: hierro (Fe), Zinc (Zn), Manganeseo (Mn), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo). (López, 1990). Los microelementos resultan indispensables para el crecimiento vegetal, ya que intervienen como activadores de sistemas enzimáticos. Se suministran al medio de cultivo bien con el objetivo de evitar cualquier carencia o se utilizan a concentraciones más altas con el objetivo de provocar una activación del crecimiento.

2.5.1.2 Vitaminas

Son compuestos orgánicos complejos necesarios para llevar a cabo ciertas funciones catalíticas en el metabolismo celular de las plantas. Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos *in vitro* y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante en los fenómenos de organogénesis.

La tiamina (vitamina B1) tiene importancia en el cultivo de células y órganos, la cual se añade en cantidades que varían de 0,1-1,0 mg L⁻¹). También se señalan efectos favorables para el ácido nicotínico (vitamina B5), la piridoxina (vitamina B6) y la riboflavina en el crecimiento de los cultivos.

Mroginski y Roca (1991) plantearon que los tejidos cultivados *in vitro* son capaces de sintetizar las vitaminas esenciales, pero su adición al medio mejora el crecimiento de los mismos; entre ellas están el mioinositol o mesoinositol, piridoxina, ácido nicotínico (vitamina B5), ácido pantótenico, ácido fólico, entre otras. La incorporación de mioinositol al medio (100 mg L⁻¹) generalmente trae como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares.

2.5.1.3 Aminoácidos

Pueden acumularse de forma libre en los tejidos o asociarse entre sí formando proteínas, la proporción en que esto ocurre varía en dependencia de las variedades y especies, el oxígeno y los estados nutricional, fisiológico y ambiental. En ocasiones, se verificó el efecto antagónico de algunos aminoácidos en relación con la biosíntesis de otros. Algunos incorporan el nitrógeno más rápido al medio que el propio nitrógeno inorgánico; puede prescindirse de ellos si el balance de sales inorgánicas es adecuado. Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelatantes.

Se utilizan preferiblemente los L-isómeros: L- cisteína, L- adenina, L- asparagina y L- serina. Tienen diferentes funciones en sistemas: la L- glutamina, y la L- asparagina son transportadores de nitrógeno, L- arginina estimula la raíces; L- serina es empleada en el cultivo de microporos y L- cisteína es un agente reductor, la glicina se utiliza como suplemento (Pierick, 1991).

2.5.1.4 Carbohidratos

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos y, por tanto, es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa en el rango comprendido entre 2-5% es el azúcar que más se utiliza (Nkere *et al.*, 2009; Zuraida *et al.*, 2014), se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas (Roca *et al.*, 1991).

2.5.1.5 Compuestos naturales

Dentro de los compuestos naturales pueden citarse: extracto de levadura (50-500 mg L⁻¹), proteína hidrolizada (30-300 mg L⁻¹) es fuente de aminoácidos, jugo de naranja (30 %), jugo de tomate (30 %), pulpa de plátano (159 g L⁻¹), emulsión de pescado (1 cm³ L⁻¹), endospermo líquido de coco: contiene ácido orgánico, aminoácidos, ácido maleico, vitaminas, azúcares, reguladores del crecimiento, minerales (10- 20 %) y extracto de malta (50-200 mg L⁻¹).

A pesar de la dificultad en el análisis de su composición y la poca información en la literatura acerca de los efectos que tienen los componentes orgánicos, estos son ricos en energía, vitaminas, aminoácidos y fitohormonas (Yam y Arditti, 2009; Yong *et al.*, 2009).

Estos compuestos no deben emplearse en altas concentraciones; de ellos, el agua de coco es la que más se utiliza en los medios de cultivo, por eso muchos autores validan a este compuesto natural como una alternativa en los sistemas de micropropagación (Salazar, 2012; Domínguez-Larrinaga *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2013).

2.5.1.6 Antioxidantes

Se utilizan en los medios de cultivos en concentraciones que oscilan de 1 a 5 mg L⁻¹, para contrarrestar la acción de los compuestos fenólicos producidos por el tejido dañado durante la desinfección y el corte, que pueden provocar la muerte del

explante. Entre estos pueden citarse: la L-cisteína, el ácido cítrico, el carbón activado, PVC (polivinil pirrolidona) y el DMSO (dimetil sulfóxido) (Alvarenga, 2007; Gantait *et al.*, 2009; Beltrán *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010).

2.5.1.7 Materiales inertes o de soporte

Comúnmente se emplea el agar entre 6-10 g L⁻¹ como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos, este soporte evita que el explante se sumerja en el medio de cultivo. También se utilizan el Gelrite y el Phytigel en concentración de 2 y 8 g L⁻¹, respectivamente (Medero *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2010).

El medio líquido estacionario reúne todos los aspectos positivos del medio sólido, con la ventaja de que son eliminadas algunas sustancias inhibitoras que a veces están presentes en los geles solidificantes. Es usual el empleo de papel de filtro como soporte y absorbente. El medio líquido en agitación favorece el intercambio gaseoso y la polarización de los tejidos por acción de la gravedad, así como también los gradientes de nutrientes en el medio y en la superficie de los tejidos. La utilización de un medio líquido o sólido depende a menudo de las ventajas, hábitos y/o disponibilidad del usuario.

No menos importante es el papel que desempeña el pH del medio, este se ajusta con KOH o NaOH y su rango oscila entre 5-6. Después de pasar por la autoclave los medios, el pH varía y también en el curso del desarrollo del cultivo.

2.5.1.8 Reguladores del crecimiento

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades incrementan, inhiben o modifican de una forma u otra cualquier proceso fisiológico del vegetal (Davies, 2004).

El desarrollo de plantas *in vitro* es producto de la interacción cuantitativa entre reguladores del crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas (Pierick, 1991; Roca *et al.*, 1991).

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos (luz, nutrientes, agua, temperatura) e internos (hormonas). Una definición abarcadora del término hormona es considerar bajo este nombre a cualquier producto químico de

naturaleza orgánica que sirve de mensajero químico, ya que se produce en una parte de la planta y tiene como "blanco" otra parte de ella (Toledo *et al.*, 1998).

Las fitohormonas comprenden a seis grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural. Se incluyen al etileno, auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y brasinoesteroides cada uno con su estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta (Taiz y Zieger, 2006).

En el cultivo de tejidos se utilizan los siguientes tipos de reguladores de crecimiento:

a. Auxinas

El nombre auxina significa en griego 'crecer' y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación celular. El ácido indolacético (AIA) es la forma predominante, sin embargo, evidencias sugieren que existen otras auxinas indólicas naturales en las plantas (Barceló *et al.*, (1995).

Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas, cuando son conjugadas se hallan metabólicamente unidas a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible. La concentración de auxinas libres en plantas varía de 1 a 100 mg kg⁻¹ de masa fresca. En contraste, la concentración de auxinas conjugadas en ocasiones, es sustancialmente más alta (Alvarenga, 2007).

Una característica sorprendente de las auxinas es la fuerte polaridad a través de la planta. Las auxinas se transportan por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipetal desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, de esta forma mantiene la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión.

Las auxinas están implicadas en la regulación de un número de procesos fisiológicos como son: crecimiento y diferenciación celular, crecimiento y la maduración de frutas, formación de raíces, floración, senescencia, geotropismo, retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes, dominancia apical y geotropismo (Li *et al.*, 2006).

El efecto inicial de la hormona para regular posteriormente los diversos eventos fisiológicos es aún desconocido. Durante el alargamiento celular estimulado por las auxinas se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones manejada por la ATPasa de la membrana plasmática, y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas.

Entre las auxinas sintéticas más empleadas se encuentran: ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol butírico (AIB) (Tromas y Perrot- Rechenmann, 2010). Son utilizadas para el establecimiento de los cultivos *in vitro*: ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (Kieffer, Neve y Kepinski, 2010; Mora *et al.*, 2010; Sajeevan *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013).

Según López (1990), la actividad auxínica en células cultivadas *in vitro* se puede clasificar de acuerdo con su potencia de la siguiente manera: 2,4-D>ANA>AIB>AIA. En la práctica el uso de las auxinas es un arte; es imposible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar en un solo caso. El 2,4-D es una auxina tóxica a concentraciones altas, su empleo es amplio, muchas veces ligado a citoquininas, en trabajos de cultivos celulares, embriogénesis somática, etc. Estas fitohormonas participan en la expresión de diferentes genes, por ejemplo Savatin, *et al.*, (2011), al aplicar concentraciones de AIA (Ácido indolacético) a plántulas de *Arabidopsis thaliana* L, observó la activación de un grupo de genes que se expresaron ante la presencia de estas hormonas considerándolos genes marcadores para las auxinas, entre ellos *IAA* (*IAA5* [At1g15580], *IAA19* [At3g15540], *IAA20* [At2g46990], *IAA22* [At1g19220], *SAUR16* [At4g38860], *SAUR-AC1* [At4g38850] y *GH3.3* [At2g23170]. Respecto al gen *SAUR16*, comenta que este gen se utiliza rara vez como marcador de respuesta a las auxinas, sin embargo se empleó porque es fuertemente reprimido ante la presencia de los oligogalacturónidos.

Según la base de datos encargada de recoger todos los testimonios de microarreglos de *Arabidopsis thaliana* L (GENEVESTIGATOR (2014)), existen registros donde se emplea la auxina ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) en la expresión de iguales genes.

b. Citoquininas

Inicialmente fueron llamadas quininas; sin embargo, al uso anterior del nombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adoptó el término citoquinina (citokinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemos y en la punta de las raíces y se traslocan muy poco o casi nada en la planta. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles (Taiz y Zieger, 2006).

Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, donde se produce una rápida división celular (Kuderova *et al.*, 2008).

Otros efectos generales de las citoquininas en plantas incluyen: estimulación de la germinación de semillas, ruptura del letargo de semillas, estimulación de la formación de frutas sin semillas, inducción de la formación de brotes laterales, tropismos, mejora de la floración, alteración en el crecimiento de frutos, ruptura de la dominancia apical, estimula el desarrollo de los brotes laterales y modulando el estrés abiótico (Friml *et al.*, 2002, Riefler *et al.*, 2006, Laplaze *et al.*, 2007, Tran *et al.*, 2007, Kuderova *et al.*, 2008, Dubrovsky *et al.*, 2008,; Argueso *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2012; Chacón y Cáceres, 2012).

En cultivo de tejidos, la 6-bencilaminopurina ó 6-benciladenina (6-BAP o BA) (Rodríguez *et al.*, 2010; Markovic *et al.*, 2013) y las citoquininas sintéticas: 6-furfurilaminopurina (Kinetina) y thidiazuron (TDZ) son las más empleadas (Chotikadachanarong y Deheeranupattana, 2013; Gomes *et al.*, 2013). Las concentraciones en que se utilizan varían entre 0.1-10 mg L⁻¹.

El efecto de las citoquininas en el crecimiento y la morfogénesis *in vitro* es importante, pues se considera que si la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo es baja, favorece la formación de tallos y lo contrario promueve el enraizamiento (Buchanan *et al.*, 2000, Persinova *et al.*, 2008).

Algunos autores consideran que la citoquinina 6-BAP tiene mayor respuesta comparada con otras hormonas como la Kinetina, TDZ y 2-isopenteniladenina (2iP), ya que promueve la formación de un mayor número de brotes y son de mayor longitud, lo que se traduce en un mayor coeficiente de multiplicación (Pérez *et al.*,

2002, Domínguez, 2011). Además, el 6-BAP es metabolizado por los tejidos mucho más fácil que el resto de los reguladores sintéticos y es capaz de inducir la producción de otras hormonas naturales como la Zeatina (Malik *et al.*, 2007).

c. Giberelinas

Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de raíces y en semillas en desarrollo y son transportadas por el xilema y el floema. La hormona no muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como ocurre en las auxinas, aunque es posible que en algunas especies exista un movimiento basipetal en el tallo (Pierick, 1991).

Además de encontrarse en el floema, las giberelinas también son aisladas de exudados del xilema, lo que sugiere un movimiento más generalmente bidireccional de la molécula en la planta.

Su acción va dirigida hacia el crecimiento de entrenudos, eliminan la dormancia de yemas y semillas, inducen y aceleran la floración, intervienen en la tuberización, como acción contraria debe señalarse la inhibición del crecimiento normal de raíces y tallos en cultivo de callos (Bari y Jones, 2009; Lalitha *et al.*, 2013). El ácido giberélico (AG₃) fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta.

d. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA), conocido anteriormente como dormina o abscisina, es un inhibidor del crecimiento natural presente en las plantas. Inhibe el crecimiento vegetativo de órganos, la fotosíntesis, regula la dormancia y germinación y la respuesta a los diferentes estreses abióticos y bióticos (Ton *et al.*, 2009, Cutler *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2010).

Esta hormona juega un papel regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, la abscisión de hojas y frutos y el estrés hídrico, y por lo tanto tiene efectos contrarios a las de las hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas). Típicamente la concentración en las plantas es entre 0,01 y 1 mg L⁻¹, sin embargo, en plantas marchitas la concentración puede incrementarse hasta 40 veces. El ácido abscísico se encuentra en todas las partes de la planta, sin embargo, las concentraciones más altas parecen estar localizadas en semillas y en frutos jóvenes en la base del ovario (Taiz y Zieger, 2006).

Este grupo bloquea el efecto del AG_3 y de las citoquininas, es estimulante de la abscisión de las hojas y de la dominancia, inhibe la síntesis de ARN, promueve el cierre estomático. Se utiliza en casos muy especiales, como por ejemplo para estimular la sincronización de la embriogénesis somática en ciertos cultivos (González *et al.*, 2006; Alvarenga, 2007).

Recientemente son varios los grupos que trabajan en dilucidar los mecanismos moleculares por los que ABA regula el crecimiento de la raíz primaria en los vegetales, tomando como referencia *Arabidopsis thaliana* L y creando mutantes sensible e insensibles para inhibición del crecimiento de la raíz primaria frente a ABA (Ren *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012).

e. Etileno

El etileno (C_2H_4), es un hidrocarburo muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Aunque se conoce desde principios de siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión, no fue sino hasta la década del 60 del pasado siglo que se empezó a aceptar como una hormona vegetal.

El etileno parece producirse por todas las partes de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejido específico y su estado de crecimiento y desarrollo. Se encontró que las alteraciones en la tasa sintética están asociadas al desarrollo de ciertas respuestas fisiológicas en plantas y sus secciones, por ejemplo, la maduración de frutas climatéricas y la senescencia de las flores.

El etileno es una hormona vegetal en forma de gas, indiferente a la luz y oscuridad. Tiene efectos sobre la maduración, abscisión, senescencia, dormancia, floración y otras respuestas (Harper *et al.*, 2000, Rahman *et al.*, 2002, Swarup *et al.*, 2002, Alonso *et al.*, 2003).

f. Brasinoesteroides y sus análogos

Los brasinoesteroides están considerados desde 1997 como la sexta clase de hormonas vegetales. En la actualidad la brasinólida (Figura 1), junto con otros 58 compuestos similares estructuralmente se agrupan en esta familia (Bajguz y Hayat, 2009).

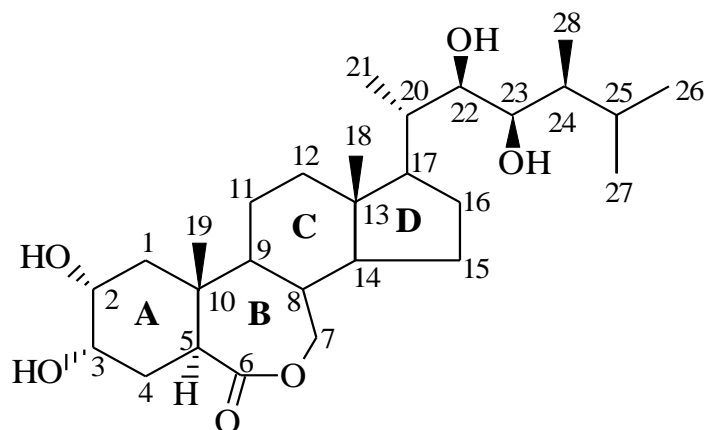


Figura 1. Estructura de la brasinólida (Cita Izquierdo, 2013).

Los brasinoesteroides son derivados de esteroides polihidroxiados con una estructura muy similar a su contraparte esteroidal en animales. Se encuentran en las plantas a muy bajas concentraciones y distribuidos a lo largo de todo este reino (Clouse, 2002).

Según Núñez *et al.*, (2013), son compuestos de un grupo de polihidroxiesteroides que existen naturalmente y que son derivados del 5α colestano, estimulantes del crecimiento de las plantas. Estos reguladores además de manifestar una respuesta sinérgica con las auxinas, se emplean a menores concentraciones que éstas, para lograr los mismos efectos (Goda *et al.*, 2004).

Los brasinoesteroides se encuentran, entre otros órganos, en el polen, las hojas, las yemas, las flores y las semillas en proporciones y formas diferentes (Seeta *et al.*, 2002). Son identificados químicamente más de 50 brasinoesteroides de fuentes vegetales y la brasinólida es la que posee mayor actividad biológica.

El Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, trabaja en la síntesis de análogos de brasinoesteroides (MH5, Biobras-6, Biobras-16, entre otros), estos constituyen nuevas sustancias reguladoras de producción nacional, capaces de influir en varios procesos fisiológicos en el vegetal, como la elongación y división celular y también involucran respuesta en las plantas a estrés abióticos (Núñez *et al.*, 2010).

Los análogos de brasinoesteroides también se emplean en la biotecnología agrícola cubana, por ejemplo García *et al.*, (1997), empleó formulaciones conocidas como Biobras-6 y MH-5, evidenció que estimuló la formación de callos en café (*Coffea*

canephora cv. 'Robusta') en sustitución de la citoquinina 6-BAP. Posteriormente, en los últimos años existe bastante información sobre el empleo de estas sustancias en los protocolos de micropropagación de cultivos de reproducción agámica como es el caso del género *Musa* spp. (Héctor *et al.*, 2007; Izquierdo, 2013).

Teniendo en cuenta los avances logrados en el estudio de estas sustancias y sus análogos a nivel mundial, es muy probable en breve tiempo se pueda esclarecer sus mecanismos y modo de acción en los tejidos vegetales.

2.6 Otras sustancias empleadas como reguladores del crecimiento

La tendencia actual de la biotecnología agrícola, es la búsqueda de sustituyentes de origen biológico y/o químico en la optimización de los medios de cultivo con vistas a mejorar la eficiencia económica del proceso, al emplear insumos nacionales, técnicas sencillas, confiables y menos costosas, con el fin de sustituir total o parcialmente los reguladores del crecimiento empleados tradicionalmente en los costosos y complejos esquemas de micropropagación de las diferentes especies vegetales. (González *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2010; Izquierdo, 2013). Entre estas sustancias de producción nacional, empleadas en la biotecnología vegetal se encuentran:

2.6.1 Biopreparados bacterianos

Actualmente, diferentes laboratorios en el mundo están encaminados en la búsqueda de soluciones alternativas en la utilización de microorganismos de la rizosfera que estimulan el crecimiento y los mecanismos de defensa de las plantas (Compant *et al.*, 2010, Souza *et al.*, 2010). La colonización de las raíces de las plantas por especies de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) ofrece perspectivas de desarrollo interesantes en cuanto a la agricultura sostenible, ya que permiten la obtención de altos rendimientos de las cosechas, sin la utilización de altas concentraciones de productos químicos con efectos nocivos (Hassan *et al.*, 2010).

En este sentido, algunos grupos de investigadores cubanos trabajan en la búsqueda de algunas rizobacterias y muy en particular las asociadas al maíz (*Zea mays* L) y trigo (*Triticum aestivum* L), en diferentes regiones del país (Hernández *et al.*, 2002). Fueron aisladas e identificadas diferentes especies de RPCV, dentro de ellas

Pseudomonas fluorescens M., *Pseudomonas aeruginosa* M. y más de 20 cepas de *Burkholderia cepacia* (Hernández *et al.*, 2004; Torriente, 2010).

El empleo de estas cepas de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, originó un bioproducto que induce resistencia a lo largo del ciclo de desarrollo de la planta y también se apreció los efectos de estimulación del crecimiento del sistema radical, así como de la germinación en ciertas especies vegetales. Cabe destacar, una clara mejoría de la productividad en los cultivos de maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), frutabomba (*Carica papaya* L.), café (*Coffea arabica* L.) y plantas ornamentales, después de ser tratadas con este biopreparado, el cual puede utilizarse también como sustituto de reguladores del crecimiento durante la propagación masiva de plantas (González *et al.*, 2007).

2.6.2 Liplant y Biostan

Diferentes productos fueron obtenidos a partir del humus líquido y el vermicompost, como es el caso del Liplant® y Biostan®, producidos por la Universidad Agraria de La Habana (UNAH), como alternativas a considerar para la nutrición de las plantas, teniendo en cuenta que son productos derivados del humus de lombriz, aportan nutrientes en forma inorgánica, que por difusión entran al tejido de la planta; además, contiene fracciones de sustancias promotoras del crecimiento con los que se han obtenido resultados satisfactorios en la propagación *in vitro* del plátano macho (Díaz *et al.*, 2004, Héctor *et al.*, 2005, Tirado y Cabañas, 2012), obtención de callos de arroz (Godoy *et al.*, 2006) y en la aclimatización de vitroplantas de piña (Chea *et al.*, 2004).

2.6.3 Fitomás E

FitoMás-E es un nuevo derivado de la industria azucarera cubana que actúa como bionutriente vegetal con marcada influencia antiestrés, creado por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) y el Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) en el marco de los programas para incrementar los rendimientos de las áreas cañeras del Ministerio del Azúcar de Cuba (Montano, 2007). Tiene su efectividad en más de 40 cultivos de valor económico al contrarrestar el déficit nutricional de las plantas, así como los

efectos de la sequía, el exceso de humedad, ataques de plagas y la fitotoxicidad por agroquímicos y otros (Zuaznábar, 2008).

Su efectividad quedó demostrada también en el cultivo de plantas medicinales, pastos, las flores y en el tratamiento de césped natural, en estadios deportivos, ante situaciones de intensa sequía y sin riego (Viñals *et al.*, 2011). Esta sustancia también comienza a emplearse en la propagación masiva de plantas como estimulador de los procesos de crecimiento vegetativo (Moya *et al.*, 2010; Cabezas *et al.*, 2012).

2.6.4 Oligosacarinas

La pared celular de las plantas no es simplemente un esqueleto inerte y estático, tiene función mecánica y protectora, así mismo actúa como una matriz extracelular que interactúa con las proteínas de la superficie celular aportándole información sobre su posición y grado de desarrollo (Cosgrove, 1997). Ésta contiene numerosas enzimas y pequeñas moléculas que son biológicamente activas y que pueden modificar sus propiedades físicas hasta en pocos segundos. Entre estas moléculas bioactivas se cuentan las oligosacarinas (Taiz y Zieger, 2006).

Desde su descubrimiento, las oligosacarinas (definidas estructuralmente como fragmentos de los polisacáridos de la pared celular) son mensajeros químicos, con propiedades reguladoras específicas (Cabrera, 2000). Las oligosacarinas se desprenden de la pared celular por la acción enzimática, además de su función como reguladores de los distintos mecanismos de defensa en plantas (Ferrari, 2007; Hématy *et al.*, 2009; Galletti *et al.*, 2011; Cervone, 2012), también actúan como reguladores de distintos procesos de crecimiento y desarrollo de la morfogénesis de las plantas, regulan la síntesis y acción de las hormonas y distintos procesos de la organogénesis celular (Cabrera *et al.*, 2003; Costales *et al.*, 2007; Savatin *et al.*, 2011).

La mayoría de los múltiples polisacáridos que componen la pared celular de las plantas, su compleja estructura y proporciones dependen principalmente del estado de diferenciación de la célula, la especie y del cultivar en estudio. Los más abundantes en las paredes celulares vegetales son celulosa, hemicelulosas y las pectinas.

Las oligosacarinas son oligosacáridos solubles, producidos por la degradación parcial de los polímeros constituyentes de la pared celular y son activos biológicamente a muy bajas concentraciones, lo cual caracteriza a este grupo de biomoléculas en una nueva jerarquía hormonal (Enríquez *et al.*, 2010).

Según Bosco *et al.* (2001), los ácidos poligalacturónicos son polisacáridos gelificantes que constituyen una fracción homogénea de las pectinas que se localizan en la matriz extracelular de los tejidos más jóvenes de los frutos, y normalmente exhiben un grado de esterificación variable, generalmente las estructuras consisten en residuos de ácidos poli- α -(1-4)-galacturónico parcialmente metilados, pero con áreas parcialmente ramificadas de secciones alternadas de α -(1-2)-L-ramnosil y α -(1-4)-galacturonosil, los cuales contienen ramificaciones en la mayoría de los lados neutrales de la cadena central con residuos de L-arabinosa y D-galactosa, pero también pueden contener otros residuos tales como D-xilosa, L-fucosa y ácido D-glucurónico.

El anillo piranósido del ácido D-galacturónico aparece en la conformación de silla 4C_1 correspondiente a su forma más estable. Los enlaces glicosídicos en los carbonos uno (C-1) y cuatro (C-4) en la posición axial-axial y el número de residuos de D-galacturonatos que contiene el oligosacárido define su grado de polimerización (Schools *et al.*, 1995) (Figura 2).

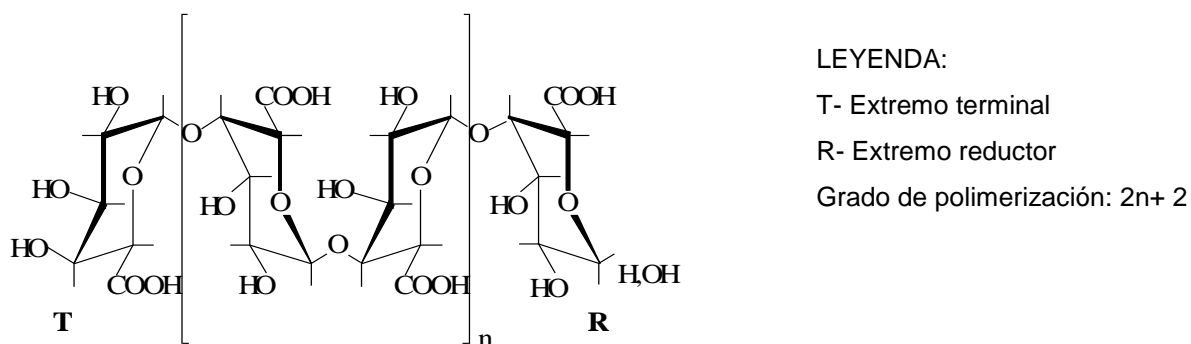


Figura 2. Estructura general de los oligogalacturónidos (Cita Izquierdo, 2013).

Según Monsoor (2005), el grado de polimerización de los oligogalacturónidos es el factor estructural de mayor significación en la definición de su función biológica. La mayoría de los estudios de dependencia estructura-actividad evidencian que un grado de polimerización igual a nueve es el tamaño mínimo de los oligómeros

biológicamente activos. Sin embargo, los fragmentos pécticos con grado de polimerización mayor de 16 presentan actividad biológica, pero esos tienen poca movilidad en el apoplasto, por lo que tienen menor importancia como moléculas señalizadoras.

La interacción de los oligogalacturónidos con la membrana citoplasmática provoca que esta se despolarice, influye en la entrada de Ca^{2+} y la salida de K^+ de la célula, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), fosforilación de las proteínas de la membrana y/o en la activación de fosfolipasas y por consecuencia, según la respuesta celular se active uno o más genes. Por ejemplo estudios en la defensa contra patógenos en *Arabidopsis thaliana* L, se observó que la expresión del gen PAD 3 fue inducida por estrés oxidativo que produjo una sobreproducción de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al aplicar oligogalacturónidos a hojas previamente inoculadas con el hongo *Botrytis cinerea* L (Ferrari *et al.*, 2007).

La producción de ROS, el H_2O_2 y los radicales de oxígeno (O^{2-}), son respuestas comúnmente denominadas explosiones oxidativas y ocurren en un corto período de tiempo después de la adición de los oligogalacturónidos (Galletti *et al.*, 2009), lo cual se demostró por varios autores en diferentes cultivos, entre ellos uva (*Vitis vinífera* L), papa (*Solanum tuberosum* L), tabaco (*Nicotiana tabacum* L) y *Arabidopsis thaliana* L (Yoshioka *et al.*, 2001; Yoshioka *et al.*, 2003; Aziz *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2006).

También, ocurre la fosforilación de las proteínas de la membrana y/o en la activación de fosfolipasas. En estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* L, esta señalización comienza con una cascada provocada por la fosforilación de las MAPKs (mitogen de proteínas kinasas) inducida por la acción de la proteína *AtPhos43*, que finalmente activa una variedad de respuestas relacionadas con la defensa, la producción y acumulación de ROS, inducción de fitoalexinas y otros metabolitos secundarios, señalización de hormonas y hasta la muerte celular programada (Galletti *et al.*, 2008, Clay *et al.*, 2009; Brutus *et al.*, 2010). En *Arabidopsis thaliana* L, MPK3 y MPK6 son proteínas quinasas MPKs activadas por patógenos y oligogalacturónidos (OGs), que inducen resistencia frente al hongo *Botrytis cinerea* L (Galletti *et al.*, 2011).

En *Arabidopsis thaliana* L, WALL- ASSOCIATED KINASE 1 (WAK 1) (siglas en inglés), se describe como receptor de los oligogalacturónidos (De Lorenzo *et al.*, 2011). Esta es una proteína quinasa transmembrana que contiene un dominio citoplasmático serina/threorina (Ser/thr) y un dominio extracelular en contacto con el fragmento de pectina de la pared celular. Los estudios permitieron confirmar cinco aminoácidos específicos involucrados con dímeros y multidímeros del homogalacturónido y la presencia de un dominio dentro del dominio extracelular de WAK 1, que influye en la transducción de señales (Brutus *et al.*, 2010).

Generalmente, los oligogalacturónidos con un grado de polimerización entre 10 y 16 moléculas de ácido galacturónido son los de mayor actividad biológica. Entre estos oligosacáridos, no se informa efectos sinérgicos ni antagónicos en la actividad biológica, por lo que diferentes autores aceptan como válido utilizar en sus trabajos de investigación mezclas de estos compuestos (Bellincampi *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 2009; Terry *et al.*, 2011) y otros prefieren emplear oligogalacturónidos puros (Denoux *et al.*, 2008; Galletti *et al.*, 2009).

Ciertos oligosacáridos fragmentados enzimáticamente por la acción de la celulasa a partir de xiloglucano (XG) *in vitro*, actúan como reguladores del crecimiento. El primer oligosacárido del xiloglucano identificado como oligosacarina fue el XG9, antagonista del crecimiento inducido por 2,4-D en segmentos de epicotilo de guisante (*Pisum sativum* L.). Posteriormente, se comprobó que la actividad antiauxínica del XG9 es absolutamente dependiente del residuo de glucosa terminal y que oligosacáridos similares al XG9, pero carentes de dicho residuo, no poseían actividad antiauxínica (Cote y Hahn, 1994).

Savatin *et al.*, (2011) demostraron en *Arabidopsis thaliana* L, que aplicaciones exógenas de oligogalacturónidos inhibieron la formación de raíces adventicias ante la presencia de la auxina (ácido indolacético); los autores concluyeron que, la aplicación de los oligogalacturónidos no involucran la estabilización de represores de respuesta de la auxina (AIA) o disminuye los niveles del receptor transcripcional a través de la acción de los microRNAs. También se demostró la respuesta rápida de un grupo de genes que son expresados ante la presencia de estas hormonas, considerándolos genes marcadores para las auxinas. Además, que la inhibición de la

respuesta de la auxina por los oligogalacturónidos, no requiere señales del etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico y es independiente de la producción de ROS o el silenciamiento post-transcripcional de genes (Savatin *et al.*, 2011; Cervone, 2015).

En Cuba, el grupo de Oligosacarinas del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), trabajó en la obtención de oligogalacturónidos con actividad en la morfogénesis *in vitro*, a partir de la degradación enzimática de la pectina de la corteza de los frutos cítricos (Cabrera y Gutiérrez, 1995). Finalmente, se obtuvo el Pectimorf[®], cuyo principio activo es una mezcla de oligogalacturónidos de origen péptico con grado de polimerización entre 9 y 16 (Cabrera, 2000).

Los resultados de diversos autores (González *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2010) muestran que este producto no solo es un potente elicitador de defensa en las plantas, también puede sustituir parcial o totalmente a los reguladores del crecimiento tradicionales y, en la mayoría de los casos, se obtienen resultados superiores. La capacidad de esta mezcla de oligogalacturónidos para inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de los callos, catalizar la degradación 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 éste como una alternativa promisoría en la biotecnología vegetal cubana.

2.7 Empleo del Pectimorf[®] en el cultivo de tejidos vegetales

Las concentraciones óptimas de Pectimorf[®] en los medios de cultivo para obtener una respuesta biológica satisfactoria oscilan entre 1 y 10 mg L⁻¹. Esta sustancia activa ofrece entre sus ventajas adicionales su solubilidad en el medio acuoso y su estabilidad en las condiciones utilizadas para preparar los medios de cultivo (Cabrera, 2002).

En protoplastos de callos embriogénicos de naranjo agrio (*Citrus x aurantium*), la regeneración de la pared celular, división y posterior formación de colonias celulares, se vió favorecida con 1 mg L⁻¹ del producto (Diosdado, 1997). En protoplastos de mesófilos de hojas el oligopectato, a la concentración de 10 mg L⁻¹, mostró una

mayor capacidad elicitora de la actividad de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) con un efecto máximo a las 8 horas (Diosdado *et al.*, 1998).

Cevallos *et al.* (1998), en el cultivo del cafeto (*Coffea canephora* cv. 'Robusta'), determinaron porcentajes de germinación superiores al 90 % y la conversión de los embriones somáticos a vitroplantas fue mayor del 44 %, cuando se combinó el Pectimorf® con AIB y kinetina. La formación de hojas verdaderas y raíces fueron superiores en la combinación del oligopectato con la kinetina, mientras que la formación de embriones secundarios fue mayor al utilizarse el producto solo.

Moré (2000) advirtió que la concentración empleada del oligopectato Pectimorf® (10 mg L⁻¹) contribuyó, en gran medida, a la movilización de las citoquininas endógenas necesarias para un adecuado desarrollo y calidad de callos en papa (*Solanum tuberosum* L.).

En el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicon* L.), al utilizarse este producto como suplemento hormonal en los medios de cultivo de cotiledones, no se obtuvieron buenos resultados con las dosis ensayadas (1, 5, 10 y 15 mg L⁻¹); en cambio, cuando se utilizaron combinaciones de Pectimorf® y 6-BAP, favoreció el desarrollo y crecimiento celular de los explantes, observándose un marcado incremento en la callogénesis (Plana *et al.*, 2003).

Díaz *et al.*, (2004) y Pinzón (2004) utilizaron esta mezcla de oligogalacturónidos (Pectimorf®) a la concentración de 10 mg L⁻¹, en la propagación *in vitro* de un cultivar de plátano AAB y banano 'FHIA-18' (*Musa spp.* AAAB), respectivamente donde se observó su efecto positivo sobre algunos indicadores del crecimiento en las fases de establecimiento, proliferación, enraizamiento *in vitro*, así como en el coeficiente de multiplicación.

En la micropropagación acelerada de dos especies de orquídeas terrestres (*Spathoglottis plicata* B y *Bletia purpurea* L), se utilizaron diferentes concentraciones de Pectimorf® en los medios de cultivo, donde se obtuvo una respuesta favorable en la germinación, la altura y el desarrollo radical de las vitroplantas provenientes de los medios que contenían dosis de 5 mg L⁻¹ del producto (Suárez *et al.*, 2006).

Hernández *et al.*, (2006) utilizó una mezcla de oligogalacturónidos en los componentes del medio de cultivo para la micropropagación de la malanga

(*Colocasia sp.*) cv. 'Camerún 14'. Al adicionar el Pectimorf® a las concentraciones de 5 y 10 mg L⁻¹ al medio de multiplicación, los autores demostraron que se incrementó significativamente el número de brotes y la altura con respecto al testigo.

En la micropropagación de la piña (*Ananas comosus* L.), Moya *et al.*, (2006), evaluaron el efecto de Pectimorf® en la fase de multiplicación sobre los indicadores del crecimiento, reflejando que el tratamiento que contenía la dosis de 10 mg L⁻¹ de Pectimorf® fue el que mejor se comportó para los indicadores número de brotes y número de hojas por planta.

Cid *et al.* (2006) demostraron el efecto sinérgico del Pectimorf® con AIA, que repercutió en el incremento del porcentaje de germinación de cápsulas de semilla artificial de caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.), sin reacción en la interacción del oligosacárido con la giberelina, aunque en el tratamiento donde se combinaron el Pectimorf® con ambos reguladores del crecimiento (AIA y GA₃) fue donde se logró el mayor número de plantas.

En igual cultivo, Nieves *et al.* (2006) demostraron que la combinación de 5 mg L⁻¹ de Pectimorf® con 1,5 mg L⁻¹ de 2,4 D, tuvo un efecto positivo sobre la formación de embriones, favoreciendo el número de embriones por gramo de tejido y la homogeneidad de estos en los estadios más avanzados de desarrollo.

En la propagación *in vitro* de *Spathiphyllum sp.*, (Hernández, *et al.*, 2009) observaron que el tratamiento consistente en la reducción del 6-BAP a la mitad de la concentración a utilizar en el medio control (0,5 mg L⁻¹) y la adición de 10 mg L⁻¹ de Pectimorf® produjo la mayor cantidad de brotes en las plantas.

Hernández *et al.* (2010) logró el establecimiento de una línea celular embriogénica a partir del cultivo de óvulos fecundados de mandarina (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) cv. 'Cleopatra', donde el Pectimorf® 10 mg L⁻¹ resultó el mejor tratamiento para la obtención de embriones somáticos en este cultivar.

Izquierdo (2013) demostró que la inmersión de las raíces de las vitroplantas de banano (*Musa spp.*) del cultivar 'FHIA-18' durante 15 minutos antes de su plantación con Pectimorf® y la aspersión foliar a la concentración de 1mg L⁻¹ 15 días después de la plantación con igual producto, incrementó la supervivencia de las plantas en un 8 % aproximadamente con respecto al control; todas las plantas en las que se utilizó el

oligogalacturónido presentaron mayor altura, número de hojas y menor contenido de prolina foliar. La aplicación de esta sustancia péctica en las fases iniciales del crecimiento de las vitroplantas durante la fase de aclimatización, proporcionó una mejor adaptación a las condiciones *ex vitro*.

En la micropropagación acelerada de *Encyclia grisebachiana* C. se utilizaron diferentes concentraciones de Pectimorf[®], los resultados demostraron una respuesta favorable en la altura y el desarrollo radical de las vitroplantas provenientes de los medios que contenían dosis de 5 mg L⁻¹ del producto, lo cual permitió la formación de vitroplantas óptimas para la adaptación (Suárez *et al.*, 2013).

Los ejemplos anteriores nos demuestran las potencialidades de esta mezcla para ser empleada como regulador del crecimiento en los protocolos de propagación *in vitro* de diferentes especies vegetales, lo cual mejora la eficiencia económica de las técnicas biotecnológicas e influye positivamente en los procesos morfogénéticos *in vitro* de numerosas especies vegetales, lo cual repercute en vitroplantas vigorosas mejor adaptadas a las condiciones *ex vitro*.

2.8 Marcadores empleados en el estudio de la variabilidad genética

Con el desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* es necesario realizar estudios de estabilidad o variabilidad genética del material propagado, con el fin de conocer su comportamiento después de cursar por este proceso pues, en ocasiones, los materiales propagados dan lugar a regenerantes anormales u otras variantes de los cultivares de origen. Este fenómeno puede influenciarse por diversos factores entre los cuales se mencionan los siguientes: genotipo, método y medio de cultivo, número de subcultivo y factores ambientales (Azofeita, 2006).

Los métodos más empleados para evaluar la estabilidad genética de las plantas originadas por el cultivo de tejidos son los citogenéticos (Castilla *et al.*, 2009), los isoenzimáticos (Castillo *et al.*, 2010) y los moleculares (Shuju *et al.*, 2012; Kyaligonza *et al.*, 2014).

Las técnicas citogenéticas estudian los cromosomas bajo cualquier nivel de división celular (Portieles *et al.*, 2004). La estimación se realiza, generalmente, mediante el conteo de cromosomas, en cortes microscópicos preparados a partir de las puntas de raíces en crecimiento activo (Román, 2004).

Otros autores comentan, que los estudios citogenéticos permiten detectar alteraciones del número cromosómico o nivel de ploidía (Portieles et al., 2002; Román et al., 2006), los cuales pueden ser más confiables que los morfoagronómicos, ya que no están sujetos a una marcada influencia ambiental (Dueñas et al., 2004).

Las técnicas electroforéticas hacen posible el estudio de la variación genética y las similitudes y diferencias entre organismos en cuanto a la composición enzimática o proteica (González, 2002). Medina et al. (2003), realizaron estudios de estabilidad genética en plantas de yuca regeneradas a partir de embriones somáticos comparados con la organogénesis como control, y concluyeron que el número cromosómico y los zimogramas de ocho sistemas isoenzimáticos permanecieron estables.

Las isoenzimas peroxidasas intervienen en la biosíntesis de los componentes de la pared celular y la diferenciación celular. Son consideradas marcadores bioquímicos importantes de la morfogénesis y se han empleado para estudiar el efecto de los brasinoesteroides en la papa (*Solanum tuberosum*) (Castillo et al., 2010).

En estudio de afinidades genéticas en especies silvestres del género *Nicotiana*, las isoenzimas peroxidasas mostraron un total de 12 bandas, todas ellas polimórficas. Este sistema permite caracterizar cada especie de este género, ya que cada una constituye un zimotipo propio (Valdés et al., 2010).

En trabajos realizados por González (2002) y González et al. (2004), con el objetivo de detectar la posible variabilidad genética inducida por las técnicas del cultivo *in vitro* en la yuca, encontraron pequeñas diferencias en los patrones electroforéticos para el sistema isoenzimático peroxidasas en el cultivo de meristemas y la embriogénesis somática, por ejemplo, en el caso del cultivar 'CMC-76', el zimograma mostró siete bandas en total, que estaban presentes en las plantas obtenidas por embriogénesis somática y cuatro de ellas aparecieron en el resto del material, sin embargo, los resultados demuestran estabilidad del material y diferencias entre los cultivares estudiados, este sistema podría emplearse como marcador genético para diferenciar cultivares de yuca.

Las tecnologías de marcadores basados en el ADN revolucionaron el conocimiento genético a partir de los años 80. Su eficiencia consiste en que ellos se relacionan directamente con el genotipo de la planta, son aplicables en etapas tempranas de su crecimiento y del estado fisiológico de la planta (Azofeita, 2006). Entre los marcadores moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés PCR) se encuentran los microsatelites, AFLP y RAPD.

La amplificación aleatoria de ADN polimórfico, más conocida en inglés por RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA), consiste en que los fragmentos de ADN obtenidos por medio de esta técnica se amplifican en regiones aleatorias del genoma ya que los iniciadores o cebadores de la reacción son secuencias arbitrarias de ADN sintético. Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en el año 1990 (Demey *et al.*, 2003).

En plátano cultivar 'Nanjanagudu Rasabale'(AAB) se encontró que de los 50 iniciadores que se analizaron por la técnica de RAPD, todas las bandas eran monomórficas y que no había variabilidad genética entre las plántulas que se analizaron cuando se obtuvieron en un medio modificado con 6-BAP (22,4 μ M) y Kinetina (4,65 μ M) (Venkatachalam *et al.*, 2007). También González *et al.*, (2007) obtuvieron un 100% de monomorfismo en plantas de boniato (*Ipomea batatas* L), cv. 'INIVIT B 93-1' propagadas mediante embriogénesis somática y evaluada la variabilidad genética con 10 iniciadores RAPD.

En *Curcuma longa* L. cuando se emplearon explantes de bulbos de rizomas para el establecimiento *in vitro* se demostró homogeneidad genética en los propágulos que se regeneraron en comparación con las plantas madres cuando se realizó el análisis mediante RAPD (Tyagi *et al.*, 2007).

Esta técnica de marcador molecular (RADP), es una de las más empleadas para caracterizar y evaluar la variabilidad genética existente en los bancos de germoplasma, por ejemplo en la caracterización de cultivares de yuca (Zambrano *et al.*, 2003). Esta ha sido utilizada junto a los RFLPs y microsátélites para desarrollar su mapa genético (Supajit *et al.*, 2011, Olasanmi *et al.*, 2014, Kyaligonza *et al.*, 2014), así mismo, los RAPDs han sido usados para el estudio de la diversidad genética de pequeños grupos de germoplasma y para establecer las relaciones entre

la yuca y especies silvestres relacionadas (Zambrano *et al.*, 2003, Rimoldi *et al.*, 2010). Fernando *et al.*, 1996 informaron que no hubo estabilidad genética en accesiones de yuca provenientes del banco de germoplasma del CIAT después de 10 años conservadas *in vitro*, al emplear marcadores moleculares como AFLP y RAPD.

A pesar del auge de los marcadores de ADN, el empleo de las isoenzimas se mantiene vigente por ser una técnica moderadamente costosa, fácil de realizar en cualquier laboratorio, y que permite dar respuesta o complementar diferentes estudios encaminados al mejoramiento genético de las plantas.



CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento con *Arabidopsis thaliana* se desarrolló en el Departamento de Biología y Biotecnología "Charles Darwin" de la Universidad "La Sapienza", Roma, Italia y los estudios moleculares en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba. El resto de las investigaciones se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Genética y Mejoramiento de Plantas, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), ubicado en el municipio San José de Las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba.

Aspectos generales

La cristalería y accesorios, así como otros utensilios como pinzas y bisturíes que se emplearon para la manipulación de los explantes se esterilizaron a 180 °C durante una hora en estufa marca *MEMMERT* (Alemania). En cabina de flujo laminar marca *ESI FLUFRANCE* (Francia), las pinzas y bisturíes se colocaron en alcohol al 95 % y flameados en mechero de gas, dejándose refrescar antes de utilizarse nuevamente.

Condiciones de cultivo

El pH de los medios de cultivo se ajustó a $5,7 \pm 0,05$ previo a la adición del agar. La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo en autoclave, durante 20 min a 121 °C con $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$ de presión. El material vegetal se colocó en cámara de crecimiento con temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 80-90 % y luz artificial con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8h oscuridad, con una intensidad luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con el empleo de lámparas de tubos fluorescentes.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y los datos de las variables en estudio se procesaron estadísticamente mediante un Análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA completamente aleatorizado). Las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se docimaron por pruebas de Duncan. Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 10.

Material Vegetal

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* L., cultivar 'Columbia- 0' (Col-O) y los cultivares comerciales 'CMC-40' y 'Señorita' procedentes del banco de

germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* C), perteneciente al Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. *A. thaliana* es la especie con la cual la yuca comparte mayor número de secuencias, ya que casi el 90 % de los EST (del inglés Expressed Sequences Tags; Rudd, 2003) tienen una similitud significativa con esta planta.

Ambos cultivares de yuca se emplean en la producción y presentan características contrastantes en cuanto a ciclo, productividad y otros caracteres agronómicos; 'CMC-40', uno de los más extendidos en Cuba, se destaca por su productividad y ciclo corto y el cultivar 'Señorita' por su excelente calidad culinaria y ciclo más largo que 'CMC-40' (INIVIT, 2004).

3.1 Evaluación de la interacción auxina/Pectimorf®

Para determinar el efecto de Pectimorf® sobre la expresión de los genes *IAA-5* y *SAUR-16* en presencia de las auxinas AIA y ANA, se tomó *A. thaliana* como modelo biológico.

Semillas del cultivar 'Columbia-0' (Col-O) se desinfectaron y colocaron en placas multipozos que contenían medio líquido con sales de MS (Murashige y Skoog, 1962), con 50 mg L⁻¹ sacarosa y pH ajustado a 5,5±0,05. Se utilizó 10 semillas en 1 mL de medio por pozo. El material vegetal se colocó en cámaras de cultivo a 22 °C de temperatura y luz artificial con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y una intensidad luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹.

Se emplearon como reguladores del crecimiento AIA y ANA, y los oligogalacturónidos Pectimorf® con grado de polimerización (GP) entre 9 y 16 procedente del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Mayabeque, Cuba y el empleado internacionalmente purificado (O), con GP 10 y 15 procedente de la Universidad La Sapienza, Departamento de Genética y Biotecnología "Charles Darwin", Roma, Italia, ambos a igual concentración (10 mg L⁻¹).

A los 10 días, se tomaron cinco plántulas para el primer experimento que tuvo como objetivo determinar el efecto de los oligogalacturónidos en presencia de AIA sobre los niveles de transcripción de los genes *IAA-5* y *SAUR-16* (Tabla 3). Las restantes plantas se emplearon en el segundo experimento, en el que se incluyó el ANA (Tabla 4).

Tabla 3. Tratamientos para la evaluación de la interacción de la auxina AIA / OG. Experimento 1.

Tratamientos	Concentración
Agua (H)	-
Ácido indolacético (I)	0,02 mg.L ⁻¹
Oligogalacturónido purificado (O)	10,00 mg.L ⁻¹
Pectimorf [®] (P)	10,00 mg.L ⁻¹
AIA + Oligogalacturónido purificado (I+O)	0,02 mg.L ⁻¹ + 10,00 mg.L ⁻¹
AIA + Pectimorf [®] (I+P)	0,02 mg.L ⁻¹ + 10,00 mg.L ⁻¹

Tabla 4. Tratamientos para la evaluación de la interacción de las auxinas AIA y ANA / OG. Experimento 2.

Tratamientos	Concentración
Agua (H)	-
Ácido indolacético (I)	0,02 mg.L ⁻¹
Ácido naftalenacético (A)	0,02 mg.L ⁻¹
Oligogalacturónido purificado (O)	10,00 mg.L ⁻¹
AIA + Oligogalacturónido purificado (I+O)	0,02 mg.L ⁻¹ + 10,00 mg.L ⁻¹
ANA + Oligogalacturónido purificado (A+O)	0,02 mg.L ⁻¹ + 10,00 mg.L ⁻¹

Se recolectaron las plantas provenientes de cada experimento en tubos de microcentrífuga de 1 500 µL. Luego se conservaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron en ultra-congelador hasta su procesamiento.

La extracción del ácido ribonucleico (ARN) se realizó macerando en frío las plántulas y empleando Isol-RNA lysis reagent (*5-Prime, Hamburg, Germany*). El cual se trató con RQ1 DNase (Promega). El ADN complementario (cDNA) se sintetizó con el empleo de ImPro-II transcriptasa reversa (Promega), según las instrucciones del proveedor.

En el primer experimento, se determinó la expresión de los niveles de transcripción de los genes *IAA5* y *SAUR16* por el empleo de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa (*RT-PCR* del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*), de acuerdo al procedimiento descrito por Savatin *et al.* (2011). En el segundo experimento, se determinó la expresión de los niveles de transcripción de iguales genes (*IAA5* y *SAUR16*) por cuantificación relativa de la

Reacción en cadena de la polimerasa (*qRT-PCR*), según el método de Galletti *et al.* (2011).

La extensión de los genes se efectuó a partir de 1,5 μL de la mezcla de ADN complementario (ADNc) con 5 μL de tampón 10x PCR, 2,0 μL MgCl_2 (50 mM), 0,8 μL de dNTP's (10 mM), 5 pM de cebador Sentido, 5 pM de cebador Antisentido, 1 μL de Taq polimerasa (Invitrogen) y 38,5 μL de agua ultrapura. En ambos experimentos, se utilizó como control positivo y para comprobar la ausencia de carga diferencial en el gel, el gen *UBIQUITIN 5 (UBQ 5)*.

La amplificación se produjo en un termociclador marca *Progene*, mediante el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 20 s, seguido por 28 ciclos del bloque siguiente: 94 °C por 20 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 5 min. Luego se realizó un paso de extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Los productos de la PCR, se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (m/v), en solución tampón Tris-ácido acético- EDTA (TAE) y se contrastaron con bromuro de etidio (2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) para su visualización en el trasiluminador de luz ultravioleta (*Bioblock Scientific*, Francia). El experimento se repitió dos veces con similares resultados.

El análisis de *qRT-PCR* se realizó mediante el uso de un Sistema de Tiempo Real CFX96 (Bio-Rad). El ADN complementario (correspondiente a 50 ng de RNA total) se amplificó en una mezcla de reacción 30 μL que contenía 13 GoTaq Real Sistema Time PCR (Promega) y 0,4 mM de cada cebador. Tres repeticiones técnicas se realizaron para cada muestra y el análisis de los datos se realizó utilizando software LinRegPCR.

3.2 Efecto de Pectimorf[®] sobre las diferentes fases de la micropropagación de la yuca

3.2.1 Crecimiento de ápices *in vitro*

Estacas de 15-20 cm de longitud de plantas adultas de los dos cultivares y se plantaron en macetas de 850 cm^3 , las cuales contenían un sustrato compuesto por una mezcla en volumen de 25 % de materia orgánica y 75 % de suelo Ferralítico Rojo compactado (Hernández *et al.*, 2005), en una relación 1:3 v/v. Las características químicas del sustrato se muestran en el Anexo 1. Los brotes crecieron

sobre las estacas en umbráculo con estructura metálica, paredes de tela antiáfidos, techo de nylon con cubierta de malla negra de polipropileno (30 % de sombra) y piso de cemento. El riego se realizó dos veces por semana a fin de mantener la humedad en el sustrato por encima del 85 %.

Se cortaron brotes de las estacas de 50 días de edad, de ambos cultivares y se dividieron en secciones de 3 a 5 cm de longitud y al menos dos o tres yemas. Posteriormente se llevaron al laboratorio para llevar a cabo la desinfección. En cabina de flujo laminar se realizó la extracción e implantación de los ápices meristemáticos, de acuerdo al procedimiento descrito por Medero (2006).

A 250 plantas *in vitro* de 21 días de edad, se les extrajo el ápice meristemático de 0,8-1,0 mm de longitud con el empleo de un estéreo-microscopio *CARLZEISS* con una magnificación de 4X y con 20 mL del medio basal semisólido empleado tradicionalmente, que contenía las sales de MS (Murashige y Skoog, 1962), 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 20 g L⁻¹ de sacarosa y 6,5 g L⁻¹ de agar como agente gelificante. Como reguladores de crecimiento se utilizaron 0,02 mg L⁻¹ de ANA, 0,04 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0,05 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃). Se emplearon diferentes concentraciones de Pectimorf[®] (5, 10 y 15 mg L⁻¹) en sustitución y como complemento del ANA y 6-BAP, además se utilizó un tratamiento control (medio basal) y un control negativo sin los reguladores antes mencionados, para un total de 14 tratamientos. En todos los casos se mantuvo el AG₃. La tabla 5 muestra las características de cada tratamiento.

Al cabo de los 21 días, a 10 explantes por tratamiento, se les realizaron las siguientes evaluaciones:

- altura de las plántulas (cm): utilizando regla graduada se midió desde la base del tallo hasta la parte superior del ápice,
- número de hojas: mediante el conteo individual de las hojas en cada vitroplanta,
- número de raíces: conteo individual de raíces totales por vitroplanta,
- coloración de los brotes: mediante código de colores hexadecimal disponible en: <http://www.disfrutalasmaticas.com/numeros/hexadecimales-colores-nombres.html>).

Tabla 5. Tratamientos a emplear para el establecimiento *in vitro* de ápices de yuca, cultivares 'CMC-40' y 'Señorita'.

Tratamientos	ANA (mg.L ⁻¹)	AG ₃ (mg.L ⁻¹)	6- BAP (mg.L ⁻¹)	Pectimorf® (mg.L ⁻¹)
1 (Control)	0,02	0,05	0,04	-
2	-	0,05	-	-
3	-	0,05	0,04	5
4	-	0,05	0,04	10
5	-	0,05	0,04	15
6	0,02	0,05	-	5
7	0,02	0,05	-	10
8	0,02	0,05	-	15
9	0,02	0,05	0,04	5
10	0,02	0,05	0,04	10
11	0,02	0,05	0,04	15
12	-	0,05	-	5
13	-	0,05	-	10
14	-	0,05	-	15

3.2.2 Crecimiento de yemas axilares de segmentos nodales

El material de partida fueron segmentos nodales de la zona central de plántulas con 30 días de edad, establecidas *in vitro* y provenientes del medio control del experimento anterior. La implantación de los segmentos nodales se realizó en tubos de ensayo (25 X 150 mm) con 20 mL de medio sólido bajo cámara de flujo laminar.

Se utilizó el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) con reducción de microelementos y macroelementos al tercio de la concentración, tiamina, mioinositol, sacarosa y agar como agente gelificante (Anexo 2).

Se emplearon seis tratamientos con diferentes concentraciones de ANA y Pectimorf® (5, 10, 15 mg L⁻¹) en complemento o como sustituto de la auxina y dos tratamientos controles (positivo y absoluto) (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos a emplear para el crecimiento *in vitro* de yemas axilares de yuca.

Tratamientos	ANA (mg.L ⁻¹)	Pectimorf® (mg.L ⁻¹)
1 (Control)	0,01	-
2 (Control absoluto)	-	-
3	-	5
4	-	10
5	-	15
6	0,01	5
7	0,01	10
8	0,01	15

A los 21 días posteriores a la implantación se evaluaron las siguientes variables: altura de la planta (cm), número de hojas, número de raíces, longitud de las raíces (cm), número de entrenudos y masa fresca (g). Se pesó la parte aérea de las vitroplantas en balanza analítica marca *Sartorius* (Francia). Se tomaron 10 plántulas por tratamiento.

3.2.3 Número de subcultivos de yemas axilares

Como material de partida se tomaron segmentos nodales de la zona central de plántulas con 30 días de edad establecidas *in vitro* y provenientes del mejor tratamiento del epígrafe anterior.

La implantación de los segmentos nodales se realizó en cámara de flujo laminar y se colocaron de forma vertical en frascos de cristal de 7,0 cm de altura x 4,5 cm de diámetro.

Se utilizó el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) y se agregaron como reguladores del crecimiento ANA y Pectimorf®. Se emplearon tres tratamientos (tratamiento control, tratamiento libre de reguladores y tratamiento con 10 mg L⁻¹ de Pectimorf®) (Tabla 7), utilizándose iguales tratamientos hasta el cuarto subcultivo, con un periodo de 21 días entre cada subcultivo. Se utilizaron 20 mL de medio de cultivo y se inocularon tres explantes en cada frasco para un total de 30 explantes por tratamiento. En cada subcultivo se tomaron 10 explantes por tratamiento y se evaluó la altura de las plantas (cm), número de hojas, número de raíces, longitud de las raíces (cm) y número de entrenudos.

Tabla 7. Tratamientos para evaluar el efecto de Pectimorf® durante los subcultivos de yemas axilares de yuca.

Tratamientos	ANA (mg.L ⁻¹)	Pectimorf® (mg.L ⁻¹)
Control	0,01	-
Mejor tratamiento	-	10
Libre de reguladores	-	-

3.2.4 Aclimatización de las vitroplantas

Para evaluar el efecto de Pectimorf® en la aclimatización de vitroplantas de yuca se utilizaron plántulas de 30 días de edad con una altura entre 5 y 7 cm y provenientes del mejor tratamiento con Pectimorf® (10 vitroplantas) y el control con ANA (20 vitroplantas). Las cuales se extrajeron de los frascos de cristal con la ayuda de una pinza y se eliminaron los residuos de medio de cultivo con agua corriente. Las mismas se plantaron en macetas, con igual sustrato y ubicación que las características referidas en epígrafe 3.2.1. Se les colocó un frasco de cristal sobre la parte aérea durante los 10 primeros días de aclimatización para disminuir la evapotranspiración en las plantas. El experimento se repitió tres veces en igual época de plantación (marzo-abril).

Al cabo de los 12 días se seleccionaron 10 plantas del control y se asperjaron con Pectimorf® (1 mg L⁻¹). Las 10 restantes se asperjaron con agua corriente (Figura 3). Se entregó por planta 2 mL de solución a las 10:00 am.

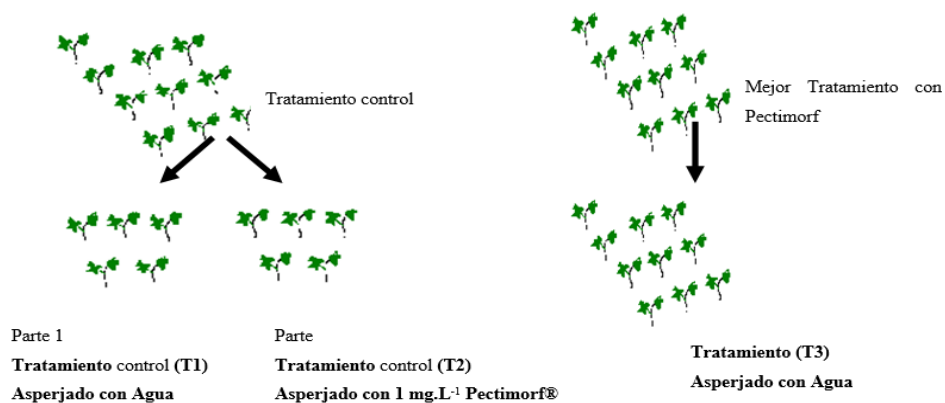


Figura 3. Esquema empleado durante la aclimatización de las vitroplantas.

El riego se realizó por microaspersión mediante sistema de nebulizadores con una frecuencia de dos riegos (mañana y tarde) y una duración de 5 minutos cada uno, con esta frecuencia se garantizó la humedad relativa superior al 80 %.

A los 45 días se evaluó la supervivencia de las plantas y al azar se tomaron cinco plantas por tratamiento para evaluar la altura de las plantas, la tasa de crecimiento (cm/día).

La tasa de crecimiento se estableció a partir de la fórmula sugerida por García (1997):

$$TAC = \frac{h_2 - h_1}{t_2 - t_1}$$

Dónde: h_2 , altura de la planta a los 45 días; h_1 , altura inicial de la planta; t_2 , evaluación a los 45 días del experimento y t_1 , días al comenzar el experimento.

Además, se determinó el diámetro del tallo de las plantas (\emptyset mm) en su zona media, la masa fresca y seca de la parte aérea (g) y el número total de raíces engrosadas. La masa seca de la parte aérea (g), al colocar sobre papel previamente rotulado, tallo y hojas de las plantas y se ubicaron en la estufa a una temperatura de 100 °C durante 72 h. Posteriormente se determinó la masa en balanza analítica hasta masa constante.

3.3 Efecto de Pectimorf® sobre la morfología y características genéticas de las plantas de yuca obtenidas por micropropagación

3.3.1 Anatomía foliar y de las raíces de las plantas obtenidas

- **Anatomía foliar**

Se emplearon 10 vitroplantas de 21 días en cultivo *in vitro* de cada uno de los tratamientos que aparecen en la tabla 6, así como plantas con 35 días después de la aclimatización del tratamiento control y el mejor tratamiento en el que se aplicó Pectimorf®.

Para extraer la epidermis de la superficie abaxial de la hoja se raspó la superficie contraria a observar, en la antepenúltima hoja, zona media y alejada del borde central. Esto permitió obtener una imagen de la distribución de los estomas y también observar aspectos de su estructura.

La lámina epidérmica de cada muestra se colocó en un portaobjeto y se añadió una gota de azul de toluidina 10 % (v/v), durante 5 min. Posteriormente se realizaron dos lavados de 5 min cada uno a la aplicación. Luego, seca la muestra se le adicionó una gota de glicerina y se colocó un cubreobjetos. Las muestras se observaron en un microscopio óptico con ampliación de luz (*Zeiss K7, Alemania*) y se fotografiaron con una cámara (Motic) acoplada al mismo. Las mediciones se realizaron sobre las microfotografías con el empleo del Programa Morfométrico *Image J* y se utilizó el instrumento de medición lineal.

Para el conteo de estomas y células epidérmicas las lecturas se realizaron al microscopio óptico (*Zeiss K7, Alemania*) con una magnificación de 400x. Las mediciones de la longitud y el grosor de las células oclusivas con una magnificación de 1 000x (figura 4). Se tomaron un total de seis campos por planta para un total de 60 campos por tratamiento.

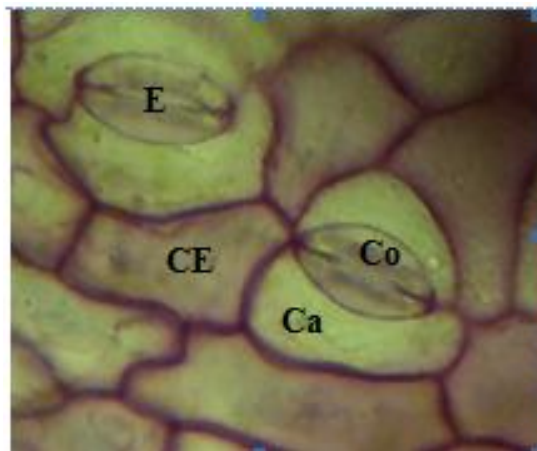


Figura 4. Fotomicrografía de la epidermis foliar de la superficie abaxial de vitroplántulas de yuca. CE- células epidérmicas, Ca- células anexas, Co- células oclusivas y E- estomas (1 000x).

Para el conteo se incluyó el estoma cuando las dos células oclusivas estaban presentes. En el caso de las células epidérmicas, cuando las mismas tenía más de 60 % en el área de la imagen. Posteriormente, se calculó el índice estomático (IE) según la fórmula sugerida por Wilkinson (1979):

$$IE = \frac{(NE * 100)}{(CE + NE)}$$

Donde: IE, Índice estomático; NE, Número de estomas por campo de observación; CE, Número de células epidérmicas en el campo de observación.

- **Anatomía de las raíces**

Se utilizaron 10 vitroplantas de yuca de ambos cultivares luego de 35 días de la aclimatización. Se emplearon dos tratamientos, el control y el mejor tratamiento en el que se aplicó Pectimorf®. Se realizaron cortes transversales a todas las raíces engrosadas en fresco a mano y con un bisturí de hacer inoxidable. Las secciones transversales se tiñeron con azul de toluidina (10 %) y se montaron con glicerina. Las muestras se observaron en un microscopio óptico (*Zeiss K7, Alemania*) a 400x con contraste de fase y se fotografiaron con una cámara (Motic) acoplada al mismo.

3.3.2 Determinación del número cromosómico en ápices radiculares de plantas micropropagadas

Se tomaron raíces procedentes de cinco plántulas de 21 días de plantadas de ambos cultivares (acápite 3.2.2) y fragmentos de estacas. Las plantas y las estacas fueron colocadas en agua con y sin la presencia del mejor tratamiento en el que se aplicó Pectimorf® (Tabla 8), a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) en frascos de cristal hasta observar la aparición de raíces.

Tabla 8. Tratamientos empleados para la determinación del número cromosómico en yuca, en los cultivares 'CMC- 40' y 'Señorita'

Leyenda	Tratamientos	Procedencia
T1	Control (brotada en agua)	Estacas
T2	Control (Agua + Mejor tratamiento con Pectimorf®)	Estacas
T3	Medio Control	Vitroplantas
T4	Mejor tratamiento con Pectimorf®	Vitroplantas

A los 15 días las raíces se trataron con una solución de 8-hidroxiquinolina al 0,02 % (m/v) durante 3 h. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de etanol-acético (3:1). El tiempo de hidrólisis fue de 15 min en ácido clorhídrico 1N a 60 °C. A continuación se procedió a la tinción con hematoxilina de Gomory 1 % (m/v) a 60 °C durante 2 h (Román y Rodríguez, 1986). Los ápices radiculares de 1 cm se colocaron en portaobjetos con ácido acético al 45 % (v/v) para

la realización del aplastamiento. El conteo del número cromosómico se realizó en 20 células por planta en cada tratamiento.

Se empleó un microscopio óptico (Ortholux Leitz, Alemania) con cámara fotográfica acoplada (Orthomat, Leitz, Alemania). Las metafases fueron fotografiadas con una magnificación de 1 000 X.

3.3.3 Estudios isoenzimáticos del material micropropagado

Los extractos foliares se obtuvieron a partir de 1 g de hojas sanas de cinco plántulas de 30 días de edad de ambos cultivares (tomadas al azar). Las plantas provenían del segundo subcultivo y de cada tratamiento (Epígrafe 3.2.3); homogenizadas en frío con 1 mL de solución de sacarosa a 20 g L⁻¹ en un mortero. Posteriormente se centrifugaron a 14 000 rpm a 4 °C durante 5 min en centrifuga refrigerada EPPENDORF 5804R (Alemania). Se extrajo el sobrenadante y se envasó en tubos de microcentrifuga de 1 500 µL y se conservaron a 5 °C hasta el momento de su análisis.

La separación electroforética se llevó a cabo en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10 % a una intensidad de corriente constante de 25 mA en cámara de electroforesis vertical *Mighty Small II de Pharmacia Biotech* (Francia) (Laemmli, 1970). El tiempo de corrida en cada caso estuvo determinado por el desplazamiento de la banda de Kolrhauch hasta aproximadamente 6 cm del inicio. Se utilizó una intensidad de corriente constante de 15 mA hasta que la banda migró al gel separador donde se incrementó la intensidad de corriente a 25 mA.

Las tinciones específicas para los sistemas isoenzimáticos fueron Anhidrasas carbónicas (E.C.4.2.1.1) (González, 1989), Esterasas (E.C.3.1.1.1), Peroxidasas (E.C.1.11.1.7), Polifenoloxidasas (E.C.1.10.3.1) y Fosfatasas ácidas (E.C.3.1.3.2) (Iglesias, 1986). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Después de las tinciones los geles fueron lavados con agua destilada y conservados en una solución de ácido acético glacial al 7 % (v/v).

La posición relativa de cada banda (Rf) se estableció en base a la distancia media de migración obtenida, dividida entre la distancia de migración del frente de corrida. Los fenotipos isoenzimáticos se establecieron en cada variante al tener en cuenta el

número de bandas y posición de la banda de tinción en cada sistema isoenzimático que se evaluó.

3.3.4 Análisis de marcadores RADPs en plantas micropropagadas

El ADN genómico total de ambos cultivares (‘CMC-40’ y ‘Señorita’) se aisló de hojas de vitroplantas obtenidas del segundo subcultivo del tratamiento control y del tratamiento con Pectimorf® (10 mg L⁻¹), se realizó por el método de CTAB propuesto por Dellaporta *et al.* (1993). La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio (5 mg mL⁻¹) (Sambrook *et al.*, 1989). La corrida se realizó en tampón TBE 1X a 110 V y 240 mA y las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz UV. La concentración del ADN obtenido se midió en un espectrofotómetro NanoDrop (Inc. Wilmington, USA) y se ajustó con agua mili Q estéril a 50 ng µL⁻¹. Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su análisis.

Las amplificaciones se desarrollaron en un volumen final de 25 µl que contenía: 50 ng.µL⁻¹ ADN genómico, 0,4 µM de cada cebador RAPD evaluado, 0,2 mM de la mezcla de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1X del tampón de la enzima y 0,5 U de *Taq* polimerasa (Promega). Los cebadores arbitrarios se muestran en la tabla 9.

Las reacciones de PCR se desarrollaron en un termociclador (*JM Research*, USA) mediante el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 30 s; seguido por 35 ciclos de tres pasos 92 °C por 1 min, 40 °C por 1 min y 72 °C por 2 min y un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min.

Tabla 9. Cebadores arbitrarios empleados en el experimento

Iniciador	Secuencia de bases nitrogenadas (5' → 3')	Temperatura (°C)
UBC-240	ATG TTC CAG G	30
UBC-256	TGC AGT CGA A	30
UBC-259	GGT ACG TAT T	30
UBC-262	CGC CCC CAG T	36
UBC-268	AGG CCG CTT A	32
UBC-270	TGC GCG CGG G	38
UBC-277	AGG AAG GTG C	32
UBC-284	CAG GCG CAC A	34

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis a 110 v y 240 mA en gel de agarosa al 1,5 % (m/v), con tampón Tris- Borato- EDTA (TBE) 1X (0,09 M Tris- borato, 0,002 M EDTA, pH 8) a 110 V y 240 mA. Las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados se visualizaron por marcaje con bromuro de etidio ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) antes de observarse en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (*Bioblock Scientific*, Francia). Las bandas existentes se visualizaron a través de fotografías y evaluaron de forma binaria por su presencia (1) o ausencia (0). El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con el marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 kb DNA ladder* (Promega, USA). Se realizaron dos repeticiones por tratamiento y los resultados se expresaron en porcentaje de bandas monomórficas. En la figura 5, se muestra el esquema general de trabajo.

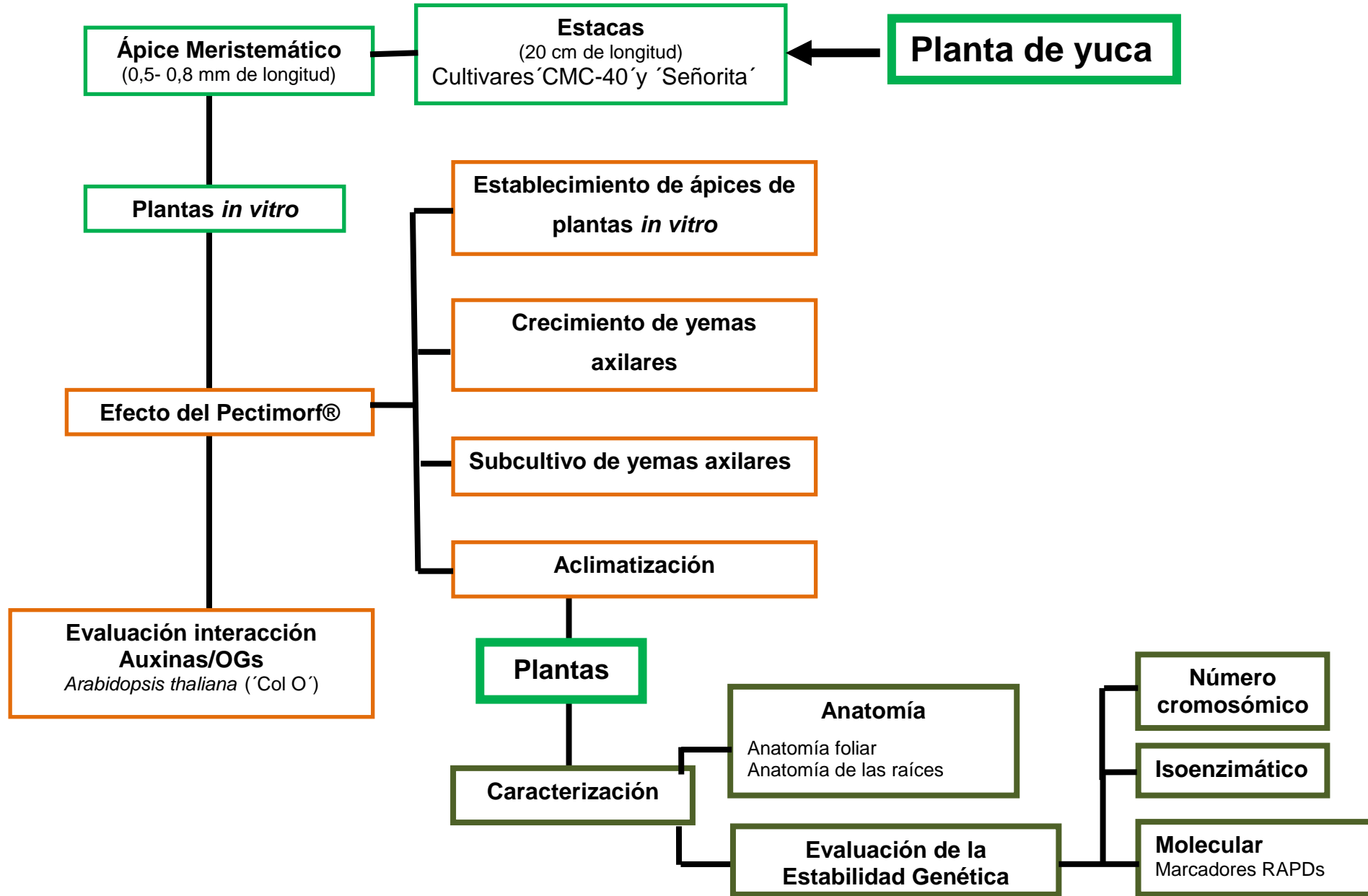


Figura 5. Esquema general de trabajo



CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Evaluación de la interacción auxina/Pectimorf®

En la figura 6, se observa que la expresión de la actividad de los genes *SAUR16* e *IAA5* fue inducida después de 1 hora de añadida al medio de cultivo la auxina AIA (I), lo cual se reflejó en la aparición de la banda correspondiente. Cuando se añadió, tanto el oligogalacturónido internacional purificado (O), como Pectimorf® (P) en ausencia de la auxina, no hubo expresión apreciable de la actividad de dichos genes. Sin embargo, cuando ambos compuestos se encontraban en presencia del AIA, se apreció una disminución en la expresión de ambos genes, mas marcada sobre *SAUR-16*.

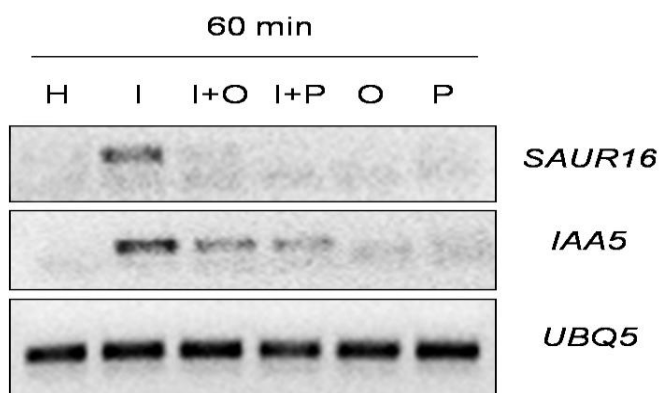


Figura 6. Expresión de los genes *SAUR-16* e *IAA-5* en presencia del Pectimorf®. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* L. 'Col O' tratadas durante 1 hora con Agua (H) o 0,02 mg L⁻¹ IAA (I), 10 mg L⁻¹ Oligogalacturónido internacional puro (O) o 10 mg L⁻¹ Pectimorf® (P).

Los resultados indicaron que Pectimorf® fue capaz de suprimir los niveles de transcripción de los genes *IAA-5* y *SAUR-16*, cuando se empleó en concentraciones similares que el OG puro, lo cual se reflejó en la disminución de la expresión para el gen *IAA-5* y la ausencia de expresión para el gen *SAUR-16*.

Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por Savatin *et al.* (2011), quienes observaron que el gen *SAUR-16* [At4g38860] fue reprimido totalmente en presencia de los oligogalacturónidos, al aplicar 0,02 mg L⁻¹ de AIA, considerándolo un gen marcador para dicha auxina y coinciden con otros autores, quienes señalaron que en explantes de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), colocados en medios de cultivo con AIA y el oligogalacturónido purificado (GP 8-16) ocurrió la inhibición de la

expresión del gen *GUS* que se relaciona con la actividad de las auxinas (Bellicampi *et al.*, 1993).

Varios estudios indican que los α (1-4)-D-oligogalacturónidos (OGs), liberados de la degradación de los homogalacturonanos (Hahn *et al.*, 1981), un componente mayor de la pectina, tienen efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas aunque, se reconoce su actividad como antagonista de auxinas. Ha sido demostrado que los OGs purificados parcialmente, suprimen la formación de raíces adventicias inducidas por el ácido indolacético (AIA) en explantes de hojas (Bellicampi *et al.*, 1993) e inhiben los niveles de transcripción de genes que son inducidos, tempranamente, por AIA, en la planta considerada un modelo biológico, *Arabidopsis thaliana* L. (Savatin *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos autores han informado un efecto estimulador del enraizamiento en frijol (Hernández *et al.*, 2006) y en peciolo de violeta (Falcón y Cabrera, 2007). Estos resultados al parecer contradictorios, pueden deberse a la constitución del medio de cultivo, así como la concentración del oligo empleada y su modo y momento de aplicación, además de la especie en cuestión.

Generalmente, los oligogalacturónidos con grado de polimerización entre 10 y 16 moléculas de ácido galacturónico son los de mayor actividad biológica. Entre estos oligosacáridos, no se informan efectos sinérgicos ni antagónicos en la actividad biológica, por lo que diferentes autores aceptan como válido utilizar en sus trabajos de investigación mezclas de estos compuestos (Bellicampi *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 2009; Terry *et al.*, 2011) y otros prefieren emplear oligogalacturónidos puros (Denoux *et al.*, 2008; Galletti *et al.*, 2009).

El Pectimorf[®], producido en Cuba, a partir de degradaciones enzimáticas parciales de las paredes celulares de cortezas de frutos cítricos, es una mezcla de OGs con grado de polimerización (GP) entre 9 y 16 (Cabrera *et al.*, 2003). Este producto, considerado un regulador del crecimiento no tradicional, ha sido empleado como sustituto de hormonas tradicionales en protocolos de micropropagación, porque estimula el crecimiento y diferenciación en diferentes cultivos, tales como malanga (Hernández *et al.*, 2009), plátanos (Izquierdo, 2013), tomate (Plana *et al.*, 2003) y caña de azúcar (Nieves *et al.*, 2006). También, es considerado un potente elicitador de defensa en plantas (Suárez *et al.*, 2013).

Los resultados demuestran que el Pectimorf[®] se comportó de forma muy similar al oligogalacturónido purificado, ambos oligos fueron capaces de perturbar los niveles de transcripción de los genes (*SAUR-16* e *IAA-5*) en presencia de la auxina AIA.

En la figura 7 se observa el efecto del oligo sobre los niveles de expresión de los genes *SAUR16* e *IAA5* en presencia de las auxinas AIA y ANA en iguales concentraciones. El oligogalacturónido purificado (O), disminuyó los niveles de expresión de ambos genes en más de un 50 %, como se había probado (Figura 1) cuando se empleo el AIA, lo cual indica que el oligo tuvo una acción similar sobre los niveles de expresión de ambos genes.

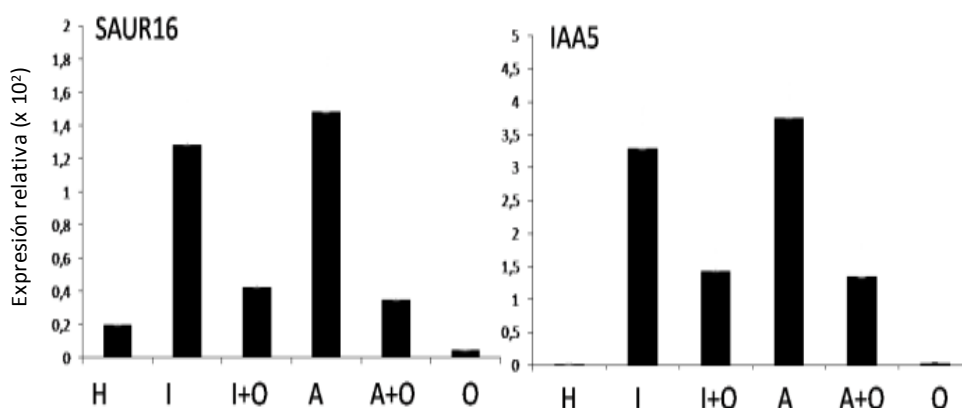


Figura 7. Expresión de los genes reguladores de las auxinas (*SAUR- 16* e *IAA-5*) en presencia del oligogalacturónido.

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* L. 'Col O' tratadas durante 1 hora con Agua (H), 0,02 mg L⁻¹ IAA (I), 0,02 mg L⁻¹ ANA (A) ó 10 mg L⁻¹ Oligogalacturónido internacional(O).

Los resultados de este trabajo apoyan lo informado por otros autores sobre las evidencias relacionadas con el antagonismo de Pectimorf[®] y las auxinas AIA y ANA (Izquierdo, 2013), ya que hasta la fecha no había sido comprobado si Pectimorf[®] poseía, al igual que los oligos purificados parcialmente, un efecto antiauxínico reportado por otros autores (Bellicampi *et al.*, 2000). También Branca *et al.*, (1998); Bellicampi *et al.*, (1993) y Goda *et al.*, (2004), señalan que los oligogalacturónidos inhiben la expresión de las auxinas.

Si bien el mecanismo molecular de la actividad antiauxínica de los OGs no está completamente estudiado, existen algunos progresos recientes para evaluar el

mismo a través de los niveles de transcripción de varios genes que son inducidos tempranamente por auxinas, entre ellos *IAA* (*IAA-5* [At1g15580], *IAA-19* [At3g15540], *IAA-20* [At2g46990], *IAA-22* [At1g19220], *SAUR-16* [At4g38860], *SAUR-AC1*[At4g38850] y *GH3.3* [At2g23170], en *Arabidopsis*, ante la presencia o no de los OGs (Savatin *et al.*, 2011).

Grunewald *et al.*, (2009), trabajaron con diferentes concentraciones de ANA (0,01, 0,1 y 1 mg L⁻¹) en plántulas de *Arabidopsis thaliana* L. y demostraron a los 30 minutos, la expresión de los genes *IAA-1*, *IAA-5* e *IAA-19*. Savatin *et al.*, (2011) en igual cultivo aplicaron a plántulas 0,02 mg L⁻¹ de AIA y observaron la activación de iguales genes y otros, que se expresaron ante la presencia de esta auxina, considerándolos genes marcadores, entre ellos *SAUR-16* [At4g38860]. Respecto al gen *SAUR-16*, comenta que este se utiliza rara vez como marcador de respuesta a las auxinas, sin embargo se empleó porque es reprimido ante la presencia de los oligogalacturónidos.

Según GENEVESTIGATOR (2004), base de datos donde se recogen todos los testimonios de microarreglos de *Arabidopsis thaliana* L., existen registros donde se emplea el AIA y ANA en el estudio de expresión del gen *IAA-5* y se requiere de concentraciones menores de ANA para lograr la expresión este gen.

Arabidopsis thaliana L es la especie con la cual la yuca comparte mayor número de secuencias, ya que casi el 90 % de los EST (del inglés Expressed Sequences Tags; Rudd, 2003) tienen una similitud significativa con esta planta. En otros estudios se han reportado similitudes importantes entre estas dos especies (López *et al.*, 2004; Sakurai *et al.*, 2007), lo cual no sólo debe considerarse a la luz de la cercanía evolutiva, sino también al alto número de EST reportados en *Arabidopsis*, lo que incrementa la probabilidad de encontrar secuencias similares (Zapata *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos demuestran que, ciertamente Pectimorf[®] posee una acción inhibitoria sobre los genes *SAUR-16* e *IAA-5* que codifican la expresión de auxinas, por cuanto, su acción favorable sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas informado por autores como Hernández *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2013, se ejerce por otras vías, estimulando quizás la expresión de otros genes

u otros mecanismos en las plantas, lo cual deberá ser estudiado y esclarecido en futuras investigaciones

4.2 Efecto de Pectimorf® sobre las diferentes fases de la micropropagación de la yuca

4.2.1 Crecimiento de ápices *in vitro*

Durante la primera semana de establecidos, se observaron algunas alteraciones en el color y morfología de los ápices en los tratamientos donde se empleó el Pectimorf®, presumiblemente debido, al aumento de la velocidad de crecimiento o división celular en esta primera fase. A pesar de ello, los ápices presentaron una coloración verde lima (32CD32) y a partir de los restantes días continuaron su crecimiento normalmente.

En la Tabla 10, se observa que hubo diferencias significativas entre los tratamientos, mostrando una respuesta diferenciada de las variables en ambos cultivares. En cuanto a la altura de las vitroplantas, en el cultivar 'CMC- 40', el tratamiento 3 con 5 mg L⁻¹ de Pectimorf® en sustitución de ANA, alcanzó el mayor valor de altura de 2,88 cm; sin diferencias significativas al control que contenía ANA y BAP, ni de los tratamientos 6 y 7, donde se añadió Pectimorf® a 5 y 10 mg L⁻¹ respectivamente en presencia de ANA y en sustitución de BAP. Resultados indican que a pesar del efecto inhibitorio sobre algunos genes que codifican la expresión de auxinas en plantas, Pectimorf® empleado en estas concentraciones en un medio de cultivo en ausencia de ANA, logró estimular el crecimiento de ápices de yuca.

En el cultivar 'Señorita', los máximos valores de altura se obtuvieron en los tratamientos 6 y 7, donde se empleó Pectimorf® en presencia de ANA a las concentraciones de 5 y 10 mg L⁻¹, los cuales no difirieron estadísticamente entre ellos y alcanzaron valores por encima de los 2 cm de altura; ambos tratamientos no difirieron del tratamiento control, tratamiento 3 (6-BAP+ 5 mg L⁻¹ Pectimorf®) y del tratamiento donde se empleó Pectimorf® en presencia de ANA a la concentración de 15 mg L⁻¹. En este caso fue necesaria la presencia de ANA + Pectimorf®, lo cual sugiere que en este cultivar el contenido endógeno de reguladores es diferente, lográndose el balance adecuado para la morfogénesis con una composición del medio de cultivo distinta de 'CMC- 40'.

Tabla 10. Efecto del Pectimorf® sobre variables morfológicas de ápices *in vitro* de yuca (n=20).

T	‘CMC- 40’				‘Señorita’			
	Altura (cm)	No. de hojas	No. raíces	Color	Altura (cm)	No. de hojas	No. Raíces	Color
1 (Control)	2,00 ab	2,8 bc	2,80 abc	verde bosque (228B22)	1,12 ab	2,00 ab	1,80 ab	verde lima (32CD32)
2	0,76 c	1,66 c	1,40 bc	amarillo (FFFF00)	0,42 b	1,00 b	0,20 d	amarillo (FFFF00)
3	2,88 a	4,00 ab	4,75 a	verde bosque (228B22)	1,34 ab	3,20 ab	3,20 ab	verde lima (32CD32)
4	0,77c	2,00 c	1,80 bc	verde bosque (228B22)	0,60 b	2,20 ab	1,00 bc	verde lima (32CD32)
5	0,85 bc	2,00 c	0,75 bc	verde bosque (228B22)	0,40 b	1,80 ab	0,40 cd	verde lima (32CD32)
6	2,12 ab	2,60 bc	3,60 ab	verde lima (32CD32)	2,08 a	3,60 a	2,40 ab	verde lima (32CD32)
7	2,37 ab	2,75 bc	3,50 ab	amarillo verde (ADFF2F)	2,18 a	3,60 a	4,00 a	verde lima (32CD32)
8	1,02 b	2,50 bc	1,50 bc	amarillo verde (ADFF2F)	1,10 ab	2,60 ab	3,40 ab	verde lima (32CD32)
9	1,20 b	4,00 b	3,00 abc	amarillo (FFFF00)	0,80 b	2,60 ab	3,00 ab	amarillo (FFFF00)
10	1,35 b	4,00 b	3,50 ab	amarillo (FFFF00)	0,64 b	3,00 ab	2,20 ab	amarillo (FFFF00)
11	1,17 b	5,50 a	2,00 abc	amarillo (FFFF00)	0,72 b	2,00 ab	1,60 ab	amarillo (FFFF00)
12	0,72 c	2,00 c	1,00 bc	verde bosque (228B22)	0,66 b	1,60 ab	2,00 ab	verde bosque (228B22)
13	1,02 b	2,25 bc	1,20 bc	verde bosque (228B22)	0,76 b	1,80 ab	1,80 ab	verde bosque (228B22)
14	1,22 b	1,75 c	0,40 c	verde bosque (228B22)	0,56 b	3,40 a	2,40 ab	verde bosque (228B22)
DE	0,41*	0,40**	0,59**		0,43*	0,46**	0,58***	

T: Tratamientos

Leyenda: T1: 0,02mg L⁻¹ ANA+ 0,05 mg L⁻¹ AG₃+ 0,04 mg L⁻¹ BAP, T2: sin presencia de reguladores (ANA; BAP)+ AG₃, T3: AG₃+ BAP+ 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, T4: AG₃+ BAP+ 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, T5: AG₃+ BAP+ 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, T6: ANA+ AG₃+ 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, T7: ANA+ AG₃+ 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, T8: ANA+ AG₃+ 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, T9: ANA+ AG₃+ BAP+ 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, T10: ANA+ AG₃+ BAP+ 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, T11: ANA+ AG₃+ BAP+ 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, T12: AG₃+ 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, T13: AG₃+ 10 mg L⁻¹ Pectimorf® y T14: AG₃+ 15 mg L⁻¹ Pectimorf®)

Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$) (* significativo para $p < 0,1$; **significativo para $p < 0,01$; ***significativo para $p < 0,001$ (DE Desviación Estándar).

Para el número de hojas, en el cultivar ‘CMC-40’, cuando se utilizó Pectimorf® en la concentración de 15 mg L⁻¹, en presencia de ambos reguladores, las vitroplantas alcanzaron 5,5 resultando el tratamiento superior, sin diferenciarse estadísticamente del tratamiento 3 (en ausencia de ANA y 5 mg L⁻¹ de Pectimorf®), pero sí del resto de los tratamientos. Sin embargo, las hojas desarrolladas en el tratamiento 3, tenían una

coloración verde bosque (228B22), lo cual no ocurrió en el tratamiento 11 (ANA, BAP, AG₃ y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf[®]), ya que estas fueron de color amarillo (FFFF00). Los resultados fueron similares a los obtenidos por Demeke *et al.* (2014) en igual cultivo, quienes señalan que un desbalance hormonal podría traer consigo alteraciones en la síntesis de pigmentos relacionados con la clorofila.

En el cultivar 'Señorita', los máximos valores en cuanto al número de hojas se obtuvieron en los tratamientos 6 (ANA, AG₃ y 5 mg L⁻¹ de Pectimorf[®]), 7 (ANA, AG₃ y 10 mg L⁻¹ de Pectimorf[®]) y 14 (ANA, BAP, AG₃ y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf[®]), los cuales no difirieron estadísticamente entre ellos, ni con el resto de los tratamientos empleados, excepto del tratamiento 2 correspondiente al medio sin reguladores del crecimiento ni Pectimorf[®], en el cual las hojas tenían un color amarillo (FFFF00) también presente en los tratamientos 9, 10 y 11. En el resto de los tratamientos la coloración de las hojas fue verde primavera (00FF7F).

El mejor tratamiento para el número de raíces en el cultivar 'CMC- 40' fue el 3, que contenía 6-BAP y 5 mg L⁻¹ de Pectimorf[®], sin diferencias significativas con el control ni con los tratamientos 6, 7, 9, 10 y 11 que contenían ANA y 5 y 10 mg L⁻¹ de Pectimorf[®], respectivamente, en el caso de los dos primeros y ANA y BAP con 5, 10 y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf[®] en el caso de los tres últimos. Por lo que, en ausencia de ANA, la concentración de 5 mg L⁻¹ de Pectimorf[®] fue capaz de inducir una mayor formación de raíces, sin embargo cuando esta estuvo presente las concentraciones de Pectimorf[®] no parecieron jugar un papel decisivo en este proceso.

Para el cultivar 'Señorita', el mayor valor para el número de raíces fue el tratamiento 7, con ANA y 10 mg L⁻¹ de Pectimorf[®], sin diferencias significativas con los tratamientos que contenían ANA en todas las concentraciones de Pectimorf[®], ni del tratamiento control en presencia de ANA y BAP y de los tratamientos 12, 13 y 14 sin ANA y BAP con las tres concentraciones de Pectimorf[®].

Estos resultados corroboran lo anteriormente planteado y evidencian una vez más que la acción de Pectimorf[®] sobre estos procesos es independiente de la presencia o no de la auxina, ya que se manifiesta en ambos casos.

En la figura 8, se observa que en los tratamientos con Pectimorf[®] se produjo un engrosamiento de las raíces, lo cual pudiera estar asociado con una mayor síntesis y

acumulación de sustancias en las mismas; este efecto ha sido informado por Álvarez *et al.*, (2011), quienes emplearon semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.) cv. PS-9 y se apreció un incremento de la longitud y diámetro del rizoma de las plantas tratadas, lo cual coincide con estos resultados.

La rizogénesis *in vitro* es un proceso complejo en el que se debe profundizar, ya que influyen múltiples factores entre los que se encuentran la composición del medio de cultivo y el origen del explante inicial (especie, genotipo y edad fisiológica).



Figura 8. Efecto de Pectimorf[®] como complemento de ANA y 6-BAP sobre el crecimiento de ápices de yuca, cultivar CMC-40. La imagen es significativa para el cultivar 'Señorita'. (de izquierda a derecha tratamiento control, tratamiento 9: ANA+ AG₃+ 6-BAP+ 5 mg L⁻¹ Pectimorf[®], tratamiento 10: ANA+AG₃+ 6-BAP+ 10 mg L⁻¹ Pectimorf[®] y tratamiento 11: ANA+ AG₃+ 6-BAP+ 15 mg L⁻¹ Pectimorf[®]).

Al parecer la rizogénesis es un proceso menos afectado en la yuca por la presencia de reguladores en el medio de cultivo, ya que para ambos cultivares en los tratamientos donde se empleó Pectimorf[®] como sustituto de los reguladores ANA y 6-BAP (12, 13 y 14) se logró la formación de raíces y la coloración fue verde bosque (228B22) (Figura 9).

En el cultivo de la yuca, son numerosos los autores que emplean como reguladores del crecimiento en los protocolos de micropropagación, la auxina ANA y la citoquinina 6-BAP, para lograr una mayor eficiencia del proceso (Ochoa *et al.*, 2012; Mayapi *et*

al., 2013). Sin embargo Medero (2006), señaló que el AG₃ juega un papel importante en la fisiología de los ápices de yuca, pues favorece el crecimiento de los entrenudos, independientemente de la composición del medio de cultivo.



Figura 9. Efecto de Pectimorf[®] como sustituto total hormonal de auxinas y citoquininas sobre el crecimiento de ápices de yuca. Imagen es significativa para los cultivares 'CMC-40' y 'Señorita'. (De izquierda a derecha tratamiento control, tratamiento 2: libre de reguladores del crecimiento ANA y 6-BAP, excepto AG₃, tratamiento 12: AG₃+ 5 mg L⁻¹ Pectimorf[®], tratamiento 13: AG₃+10 mg L⁻¹ Pectimorf[®] y tratamiento 14: AG₃+15 mg L⁻¹ Pectimorf[®]).

Otros autores emplean los oligogalacturónidos en diferentes procesos biotecnológicos como: germinación de semillas de *Spathoglottis plicata* B (*Orchidaceae*) (Suárez *et al.*, 2006), cultivo de embriones de *Citrus macrophylla* W (Bao, 2009), cultivo de brotes de malanga (*Colocassia* sp.) (Hernández *et al.*, 2006), formación de callo embriogénico de mandarina 'Cleopatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan (Hernández *et al.*, 2010) y ápices meristemáticos de bananos (*Musa* spp.) (Izquierdo, 2013).

Son numerosos los trabajos que informan que Pectimorf[®] ejerce un efecto estimulador de los procesos morfogénéticos; González *et al.*, (2004), en el establecimiento *in vitro* de yemas de boniato (*Ipomea batata* L.), emplearon Pectimorf[®] (10 mg L⁻¹) en sustitución de ácido indol-3-acético (0,05 mg L⁻¹) y ácido giberélico (10 mg L⁻¹), donde fue posible el crecimiento de las yemas en todas las concentraciones empleadas en presencia del producto.

En caña de azúcar (*Sacharum* spp.), en la fase de histodiferenciación de callos, el mayor número de embriones y la mayor sincronía ocurrió en aquellas combinaciones

en las cuales el 2,4-D se redujo, fundamentalmente en la concentración de 5 mg L⁻¹ del oligosacárido (Cid *et al.*, 2006).

En el cultivar 'CMC-40', la inclusión del Pectimorf® a la concentración más baja (5 mg L⁻¹) en sustitución del ANA (0,02 mg L⁻¹), combinado con la citoquinina 6-BAP (0,04 mg L⁻¹) resultó superior en altura, número de hojas y raíces, aunque sin diferencias con el control; sin embargo, en el cultivar 'Señorita', se requirió la presencia del ANA (0,02 mg L⁻¹) y concentraciones de 5 y 10 mg L⁻¹ de Pectimorf® para alcanzar los mejores resultados de altura, número de hojas y raíces e incluso estos tratamientos repercutieron sobre el color de las hojas, lo cual evidenció que resultaron suficientes para promover la formación de pigmentos en las hojas.

Es necesario resaltar que el empleo del Pectimorf® favoreció el establecimiento *in vitro* de ápices de yuca (*Manihot esculenta* C.) en los cultivares 'CMC- 40' y 'Señorita', sin embargo, su efecto no fue idéntico en cuanto a concentración en el medio de cultivo en ambos genotipos, lo que prueba la influencia del genotipo a la hora de establecer cualquier protocolo que involucre cambios en los reguladores y sus concentraciones en los medios de cultivo.

La actividad de las auxinas se ha relacionado con una amplia variedad de eventos celulares y actúan como una señal para una multitud de procesos de desarrollo complejos incluyendo la formación de órganos enteros (Lau *et al.*, 2012; Barbez y kleine-Vehn, 2013; Pierre-Jerome *et al.*, 2013). Sin embargo, para entender el significado biológico de estas expresiones y su interacción con las nuevas sustancias biológicas como Pectimorf®, es necesario seguir investigando los mecanismos capaces de regular la expresión de los genes involucrados en dichos procesos.

Los resultados obtenidos muestran que la acción de Pectimorf® sobre los procesos de crecimiento y desarrollo estudiados durante la micropropagación de ápices y yemas de yuca (*Manihot esculenta* C.) se ejerce independientemente de su antagonismo con la expresión de los genes *IAA5* y *SAUR16*, o bien, que esta acción es modificada por el resto de los componentes del medio de cultivo o las condiciones experimentales u otros factores asociados. La morfogénesis es un proceso complejo donde están vinculados una gran cantidad de eventos celulares regulados por numerosos genes. Según estudios realizados por González *et al.*, (2014), en

tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), sobre el efecto de la expresión de 500 genes en plantas tratadas con Xiloglucanos, oligogalacturónidos obtenidos a partir del tamarindo (*Tamarindus indica L.*), estos poseen un efecto significativo sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular, señalización, división celular y control transcripcional.

En papaya (*Carica papaya L.*) se informó por Estrella (2012), la existencia de homología de los genes que codifican para el transporte de entrada y salida de auxina, con los de Arabidopsis. Este autor señaló además que el gen *AtPIN7* es en papaya el *CpPIN5*.

Muy pocos trabajos refieren esta temática por lo cual sería un punto estratégico para el desarrollo de investigaciones futuras.

A partir de los resultados se sugiere utilizar de manera general como medio de cultivo de ápices de plantas *in vitro*, 5 mg L⁻¹ Pectimorf® como sustituto del ANA, 0,04 mg L⁻¹ 6-BAP y 0,05 mg L⁻¹ AG₃, ya que este tratamiento no tuvo diferencias significativas con el medio control para ninguna de las variables estudiadas ni para los cultivares incluidos en la investigación y haría más eficiente el proceso, al eliminar el ANA y emplear la concentración mas baja de Pectimorf®.

4.2.2 Crecimiento de yemas axilares de segmentos nodales

Al analizar la altura de los explantes (Figura 10), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en ambos cultivares. En el cultivar 'CMC-40' los mejores tratamientos resultaron 3, 4 y 5 (5, 10 y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf® en ausencia de ANA, respectivamente), sin diferencias significativas entre ellos, lo cual demuestra la posibilidad de la sustitución de ANA por el Pectimorf® en cualquiera de las concentraciones empleadas en este tipo de explante. En el cultivar 'Señorita', los mejores tratamientos fueron 4 y 5, correspondientes a las concentraciones de 10 y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf®, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos, aunque T5 no difirió del tratamiento control con ANA y de T3 con 5 mg L⁻¹ de Pectimorf®.

Este resultado pudo deberse a que Pectimorf®, a las concentraciones empleadas en ambos cultivares, fue capaz de estimular el crecimiento de las yemas en aquellos tratamientos donde no estuvo presente la auxina.

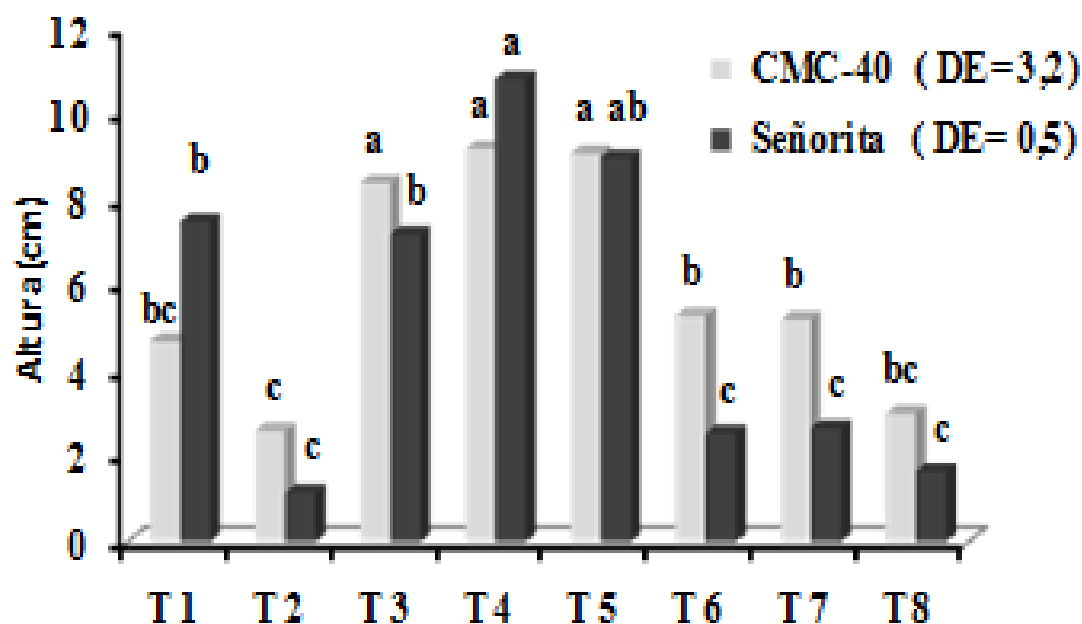


Figura 10. Efecto de las diferentes concentraciones de Pectimorf® sobre la altura de los brotes en segmentos nodales de yuca (n= 20) (T1 (**Medio Control**): 0,01 mg L⁻¹ ANA, T2 (**Medio 1**): Sin reguladores del crecimiento, T3: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, T4: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, T5: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, T6: (ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), T7: (ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), T8: (ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®)). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan (p≤ 0.05), DE (Desviación estándar).

Resultados de otros autores coinciden en que de todos los factores implicados en la respuesta morfogénica, el balance hormonal constituye el factor más importante. Estudios de correlación entre los niveles hormonales endógenos y procesos fisiológicos, así como experimentos sobre el efecto de los reguladores del crecimiento aplicados exógenamente, son corroborados por varios autores (Nordstrom *et al.*, 2004; Pernisova *et al.*, 2008; Muller y Sheen, 2008; Marković *et al.*, 2013), los cuales demuestran la importancia del balance entre auxinas y citoquininas para determinar un equilibrio adecuado entre el desarrollo foliar y radical de las vitroplantas a obtener.

Los resultados coinciden con Suárez *et al.*, (2013), quienes en la micropropagación acelerada de *Encyclia grisebachiana* C., utilizaron diferentes concentraciones de Pectimorf® en sustitución de AIA, en medio de multiplicación para esta especie, los resultados demostraron una respuesta favorable en la altura y el desarrollo radical de las vitroplantas provenientes de los medios que contenían dosis de 5 mg L⁻¹ del producto, lo cual permitió la formación de vitroplantas óptimas para la aclimatización

Al analizar el número de hojas emitidas (Figura 11), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en ambos cultivares. En 'CMC-40', el tratamiento 5 resultó superior, correspondiente a la concentración de 15 mg L⁻¹ de Pectimorf[®] como sustituto de ANA, sin diferencias significativas con los tratamientos 4 y 6, correspondiendo el primero a 10 mg L⁻¹ de Pectimorf[®] y el segundo a 5 mg L⁻¹ de Pectimorf[®] como complemento de la auxina, lo cual corrobora lo planteado anteriormente. El medio sin reguladores del crecimiento (T2) y T8 (ANA+ 15 mg L⁻¹ Pectimorf[®]), no mostraron diferencias significativas entre ellos, con los menores valores para este carácter; lo cual pone de manifiesto una vez más el papel de la concentración del Pectimorf[®] en su acción sobre los procesos en las plantas (Bao, 2009, Hernández *et al.*, 2006, Hernández *et al.*, 2010).

En el cultivar 'Señorita', el tratamiento que contenía 10 mg L⁻¹ de Pectimorf[®] en sustitución del ANA (T4), resultó superior, aunque no difirió del control con ANA (T1) ni del tratamiento con 15 mg L⁻¹ de Pectimorf[®] (T5) respectivamente; las menores valores para esta variable se obtuvieron en los tratamientos 6, 7 y 8, lo que evidencia la importancia del genotipo en la respuesta a la composición del medio de cultivo.

Los valores más bajos para esta variable ocurrieron en los medios donde se empleó el Pectimorf[®] en presencia de ANA, los cuales no difirieron del medio sin reguladores del crecimiento. Estos resultados reflejan una posible acción antagónica entre el Pectimorf[®] y la auxina, la cual ha sido enunciada por diferentes autores (Savatin *et al.*, 2011).

Resultados similares a los encontrados en este trabajo obtuvieron Lara *et al.*, (2004), quienes comprobaron el efecto estimulante del Pectimorf[®] sobre la propagación *in vitro* de segmentos de escamas de lirio (*Easter lily* sp.), siendo la concentración de 10 mg L⁻¹ de Pectimorf[®] la que favoreció la regeneración de plantas, al formar mayor número de bulbos, hojas y raíces. En experimentos desarrollados con el cultivo de la piña (*Ananas comosus* L.), el Pectimorf[®] estimuló la producción de yemas, brotes, número de raíces y desarrollo de las plántulas (Moya *et al.*, 2006).

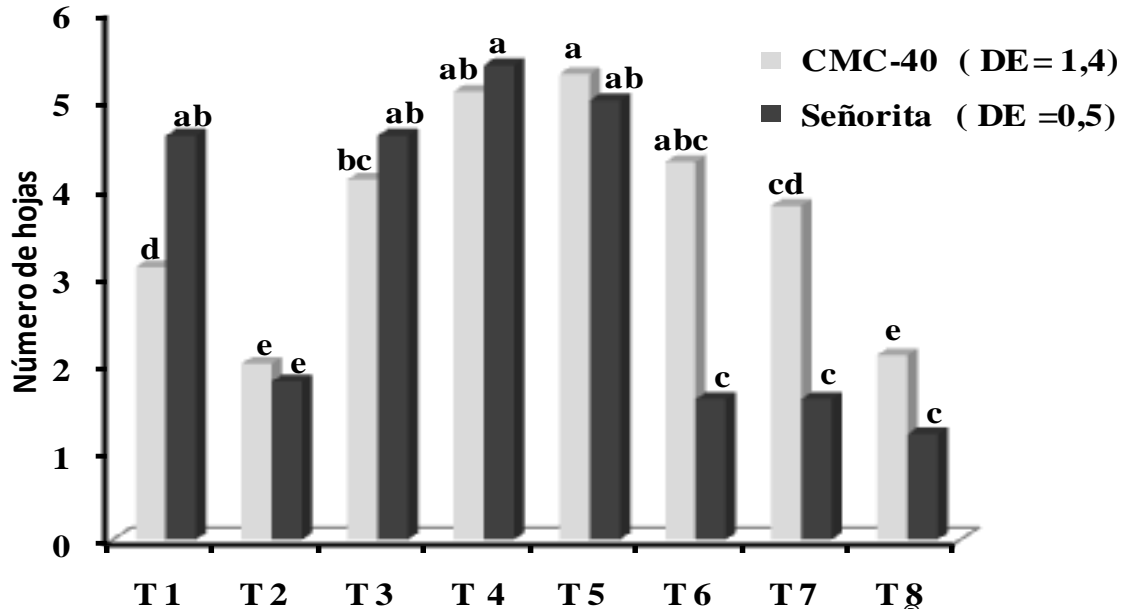


Figura 11. Efecto de las diferentes concentraciones de Pectimorf® sobre el número de hojas de los brotes de yuca (n=20) (T1 (Medio Control): 0,01 mg L⁻¹ ANA, T2 (Medio 1): sin reguladores del crecimiento, T3: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, T4: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, T5: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, T6: (ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), T7: (ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), T8: (ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®)). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan (p≤ 0.05), DE (Desviación estándar).

También Hernández *et al.*, (2009), informaron sobre las potencialidades del Pectimorf® en la micropropagación del *Spathiphyllum sp.* como promotor de procesos morfológicos. En este caso, mostró su acción al aumentar el número de hojas y brotes por lo que recomendó su empleo en el medio de cultivo a una concentración de 5 mgL⁻¹.

El empleo de Pectimorf® favoreció la formación del número de hojas como sustituto de ANA en ambos cultivares, aunque el cultivar 'CMC-40' requirió de mayores concentraciones de Pectimorf® (15 mg L⁻¹) para alcanzar los mayores valores de esta variable sin embargo, en el cultivar 'Señorita' se logró sustituir ANA por el Pectimorf®, en cualquiera de las concentraciones de éste (5, 10 ó 15 mg L⁻¹), por mostrar resultados similares al tratamiento control con 0,01 mg L⁻¹ de ANA. Este resultado es importante, ya que pudiésemos sustituir el ANA que es un regulador importado, por el Pectimorf® producto nacional.

En la figura 12, referente al número de raíces, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos empleados para ambos cultivares. En el cultivar

‘CMC-40’, los tratamientos 1, 3, 4 y 5 resultaron superiores y no mostraron diferencias estadísticas entre ellos; los mismos corresponden al medio de cultivo control con ANA y los tratamientos donde se empleó en sustitución de esta el Pectimorf® en cualquiera de sus concentraciones (5, 10 y 15 mg L⁻¹). A su vez, estos tratamientos no difirieron significativamente de T6 y T7, en los cuales se complementó el ANA con 5 y 10 mg L⁻¹ de Pectimorf®, respectivamente y éstos resultaron similares a T8, con ANA y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf®).

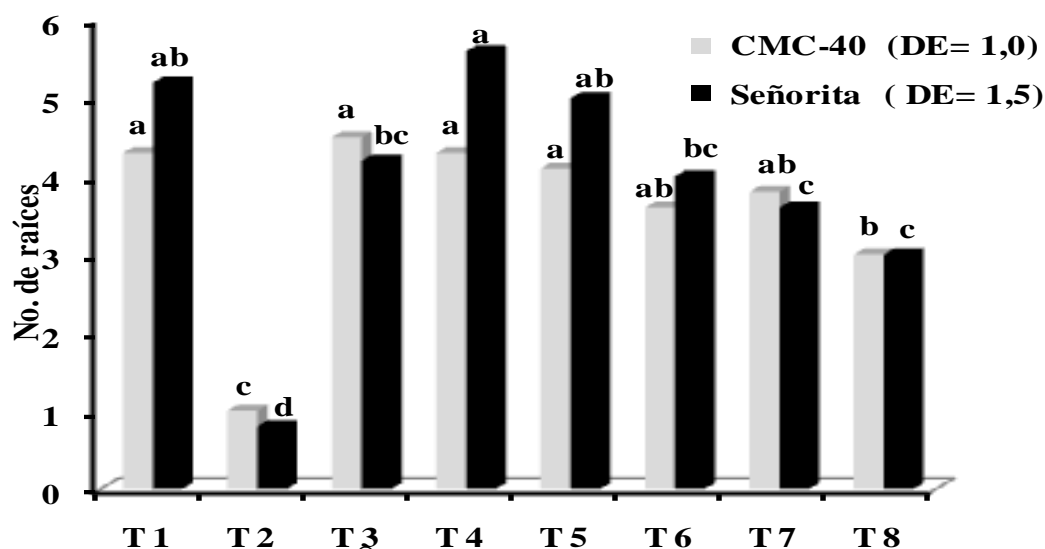


Figura 12. Efecto de Pectimorf® sobre el número de raíces de vitroplantas de yuca (n=20) (T1 (Medio Control): 0,01 mg.L⁻¹ ANA, T2 (Medio 1): sin reguladores del crecimiento, T3: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, T4: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, T5: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, T6: (ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), T7: (ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), T8: (ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®)). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan (p≤ 0.05) (* significativo para p<0,1; **significativo para p<0,01; ***significativo para p<0,001) (DE Desviación Estándar).

En el cultivar ‘Señorita’, el tratamiento 4 (10 mg L⁻¹ de Pectimorf®) en sustitución de ANA, resultó superior al resto, aunque no difirió de T1 (0,01 mg L⁻¹ de ANA) y T5 (15 mg L⁻¹ de Pectimorf®), el resto de los tratamientos tuvieron valores inferiores aunque no significativos en el caso de T3 y T6.

Como era de esperar, en ambos cultivares se observó un efecto ligeramente depresivo sobre la emisión de raíces en los tratamientos que contenían ANA y Pectimorf® en las diferentes concentraciones (T6, T7 y T8), aunque la respuesta dependió del genotipo.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible emplear Pectimorf® como sustituto de la auxina (ANA) en el medio de cultivo para estimular la emisión y crecimiento de raíces en cultivares de yuca, aunque la concentración a emplear para obtener una mejor respuesta dependió del genotipo empleado.

Esta acción estimuladora del Pectimorf® sobre el enraizamiento de plantas fue señalado por diferentes autores en varios cultivos tales como *Phaseolus vulgaris* L. (Hernández *et al.*, 2006), pecíolos de violeta africana (*Saintpaulina ionata* L.) (Falcón y Cabrera, 2007) y la micropropagación del cultivar de banano 'FHIA-18' (*Musa sp.* AAAB) (Izquierdo, 2013), donde se observó también estimulación en la producción de raíces cuando se aplicó el Pectimorf® 10 mg L⁻¹. Todo esto confirma la capacidad de este oligopeptato para inducir el enraizamiento, validándose como una alternativa promisoriosa en la micropropagación de plantas.

En cuanto al efecto de Pectimorf® sobre la masa fresca de las vitroplantas (Figura 13), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para ambos cultivares. En el cultivar 'CMC- 40', el tratamiento 4 (10 mg L⁻¹) de Pectimorf® resultó superior aunque no difirió de T1 y T5, control y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf®, respectivamente. Los tratamientos 2 y 3, correspondientes al medio sin reguladores del crecimiento y a la concentración más baja de Pectimorf® (5 mg L⁻¹), respectivamente, mostraron los menores valores de esta variable, lo cual indica que son necesarias mayores concentraciones de Pectimorf® para lograr valores superiores de masa fresca de los explantes.

Por el contrario, en el cultivar 'Señorita', el tratamiento 3 (5 mg L⁻¹) de Pectimorf® resultó superior al resto, aunque no difirió de T4 y T5, con 10 y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf® respectivamente. El menor valor para esta variable se obtuvo en el medio control, con 0,01 mg L⁻¹ de ANA, el cual no difirió de los medios en los que se empleó la auxina complementada con las tres concentraciones de Pectimorf® (T6, T7 y T8).

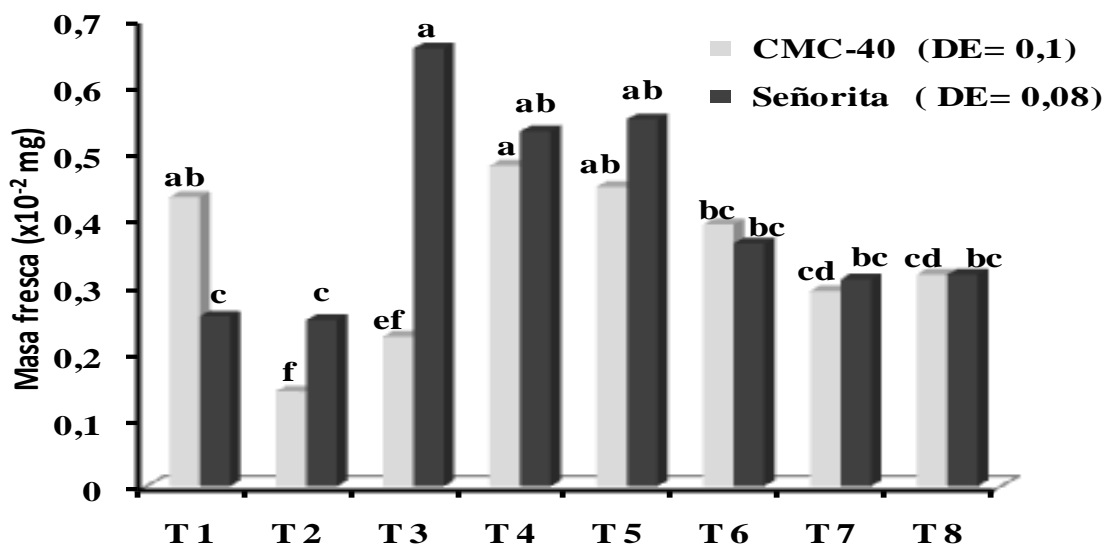


Figura 13. Efecto de Pectimorf® sobre la masa fresca de los explantes de yuca (n=20). (T1 (Medio Control): 0,01 mg L⁻¹ ANA, T2 (Medio 1): sin reguladores del crecimiento, T3: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, T4: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, T5: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, T6: (ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), T7: (ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), T8: (ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®)). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$) (* significativo para $p < 0,1$; **significativo para $p < 0,01$; ***significativo para $p < 0,001$) (DE Desviación Estándar).

En sentido general, hubo una respuesta diferenciada entre los genotipos; en el cultivar 'CMC-40' para obtener valores similares al control con ANA se requirieron concentraciones de Pectimorf® entre 10 y 15 mg L⁻¹, sin embargo, para 'Señorita' la mejor respuesta se obtuvo con 5 mg L⁻¹ aunque sin diferencias significativas con 10 y 15 y estos tratamientos superaron estadísticamente al tratamiento control. Los mayores valores de masa fresca para ambos cultivares de yuca correspondieron a las concentraciones entre 10 y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf®, en ausencia de ANA, donde también se observaron los máximos valores de altura, número de hojas y número de raíces, lo cual repercutió en un aumento de la biomasa de los explantes.

También Moya *et al.*, (2004), sustituyeron parcialmente los reguladores del crecimiento AIA y BAP, por el Pectimorf® al emplear concentraciones de 1 y 5 mg L⁻¹, informaron el incremento de la masa fresca y seca total de las vitroplantas en la multiplicación *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

La Figura 14, muestra plántulas de yuca de 21 días desarrolladas en los medios 4 y 5 correspondientes a las concentraciones 10 y 15 mg L⁻¹ de Pectimorf®, en ausencia de ANA, las cuales presentaron un buen vigor y desarrollo armónico de sus partes

aéreas y raíces, por lo que se demostró que es factible el Pectimorf® en sustitución de ANA durante el proceso de micropropagación de cultivares de yuca.

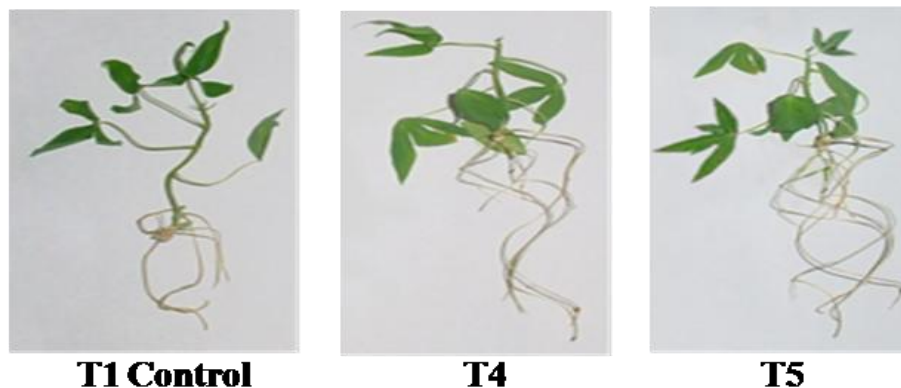


Figura 14. Efecto de Pectimorf® en el tratamiento control y mejores tratamientos en el vigor y apariencia de vitroplantas de yuca. Imagen representativa para ambos cultivares. T1 (0,01 mg L⁻¹ ANA), T4 (10 mg L⁻¹ Pectimorf®) y T5 (15 mg L⁻¹ Pectimorf®).

De los resultados obtenidos hasta este punto se puede deducir que la acción inhibitoria del Pectimorf sobre la expresión de los genes *IAA-5* y *SAUR-16* comprobada en este trabajo, resulta modificada por la presencia en el medio de cultivo de otros componentes o bien su efecto sobre los procesos de crecimiento estudiados, si bien son análogos a los efectos auxínicos en plantas se llevan a cabo mediante mecanismos diferentes a éstas, lo cual debe ser objeto de estudio en futuras investigaciones.

Los resultados de este experimento no tienen precedentes en la literatura para el cultivo de la yuca, aspecto que permite recomendar el uso del Pectimorf® en el proceso de micropropagación de este cultivo. Los resultados anteriores conllevaron a evaluar el efecto del Pectimorf® durante la multiplicación de los explantes para recomendar o no su introducción a gran escala en los esquemas de micropropagación (biofabricas) del país.

4.2.3 Número de subcultivos de yemas axilares.

Al analizar la figura 15, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos; el control fue superior estadísticamente en todos los subcultivos para la altura, número de hojas y número de nudos, sin embargo se observó una respuesta diferente para los caracteres número de raíces y longitud de la raíz, los cuales se mantuvieron elevados hasta el cuarto subcultivo. El empleo continuo del Pectimorf®

produjo un efecto depresivo sobre las variables altura, número de hojas y número de nudos, el cual se fue acentuando de un subcultivo a otro, lo que indica que el mismo solo debe emplearse al inicio del proceso de multiplicación. A partir del tercer subcultivo, las plantas provenientes del tratamiento sin reguladores del crecimiento presentaron pequeño tamaño, entrenudos muy cortos y escasa formación de raíces, debido evidentemente al agotamiento de las reservas del explante.

Con respecto al cultivar 'Señorita' (Figura 16), los caracteres evaluados no mostraron diferencias estadísticas respecto al tratamiento control en el segundo y tercer subcultivo, excepto para la longitud de la raíz, en la cual en el tercer subcultivo, el tratamiento donde se aplicó el Pectimorf® resultó superior al control y al medio sin reguladores del crecimiento. Sin embargo, a partir del cuarto subcultivo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, mostrando una inhibición de todas las variables evaluadas con la aplicación del Pectimorf®; lo que indica un efecto acumulativo perjudicial del oligo en los tejidos de las plantas. Este es un indicador muy sensible a la aplicación de los oligogalacturónidos, lo cual coincide con Hernández *et al.*, (2010) quienes plantearon en *A. thaliana* que los oligogalacturónidos provocan cambios en la arquitectura del sistema radicular.

Se observó que, el cultivar 'CMC-40' respondió mas marcadamente a las aplicaciones del Pectimorf® desde el segundo subcultivo, afectándose mas drásticamente los procesos involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plántulas, poniéndose una vez más de manifiesto el papel del genotipo en la respuesta a las variaciones del medio de cultivo, lo cual pudiera estar relacionado con las diferencias en el contenido endógeno de reguladores entre los mismos.

En este sentido, Izquierdo (2013), para la micropropagación del banano (*Musa spp*) cultivar FHIA- 18, estudió el efecto que ejerció la aplicación de Pectimorf® en la fase de multiplicación *in vitro* durante cuatro subcultivos sobre el número de brotes, altura y número de raíces por explantes. La aplicación de esta sustancia favoreció la altura y el número de brotes por explante, siendo superior en todos los subcultivos respecto al tratamiento control; sin embargo, en el cuarto subcultivo los explantes no enraizaron.

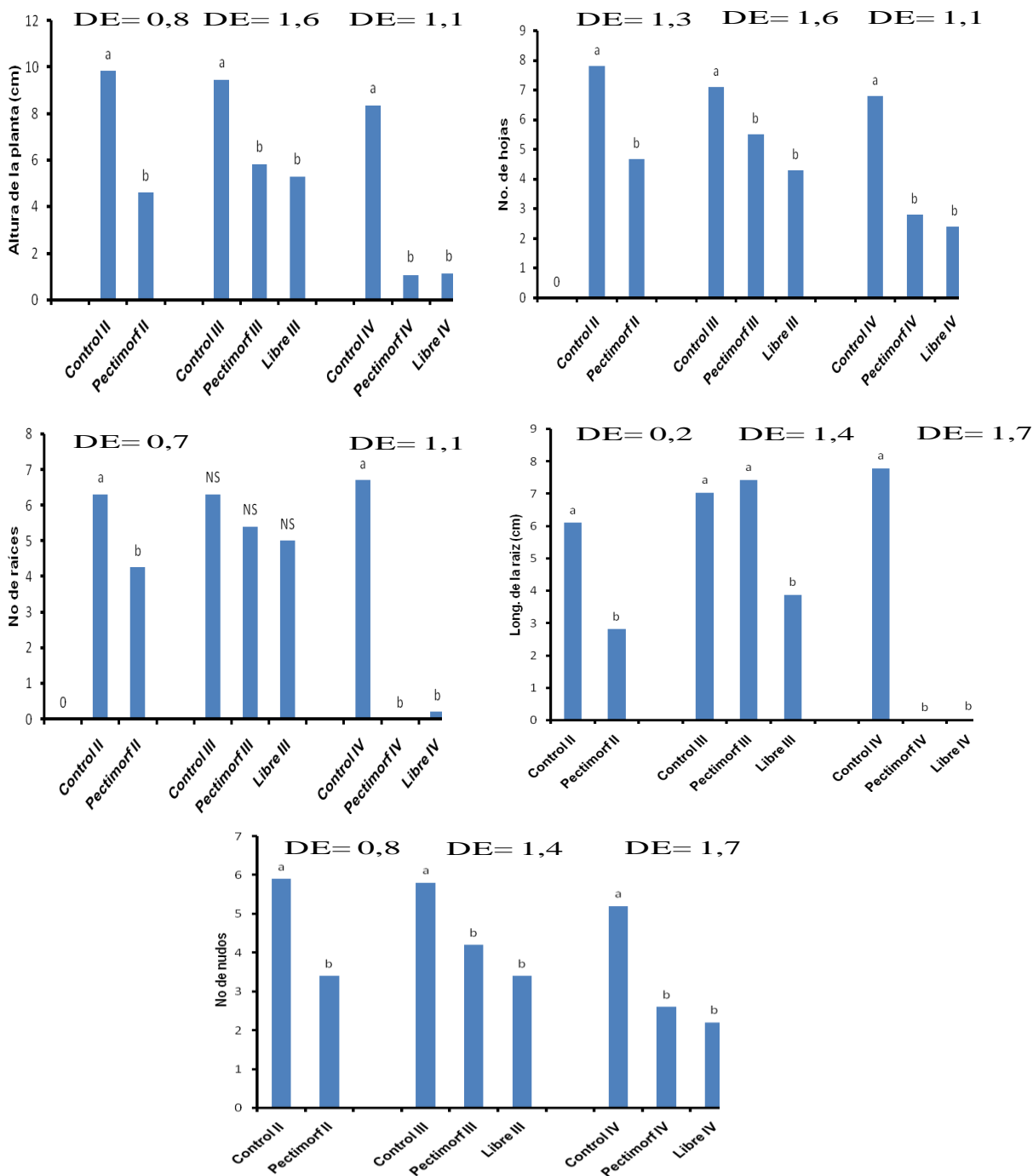


Figura 15. Efecto del Pectimorf® durante los subcultivos de yemas axilares de yuca, cultivar 'CMC- 40'. (II, III, IV- Número de subcultivos. **Medio Control**: 0,01 mg L⁻¹ ANA, **Pectimorf®**: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, **Libre**: sin reguladores del crecimiento) (DE Desviación Estándar).

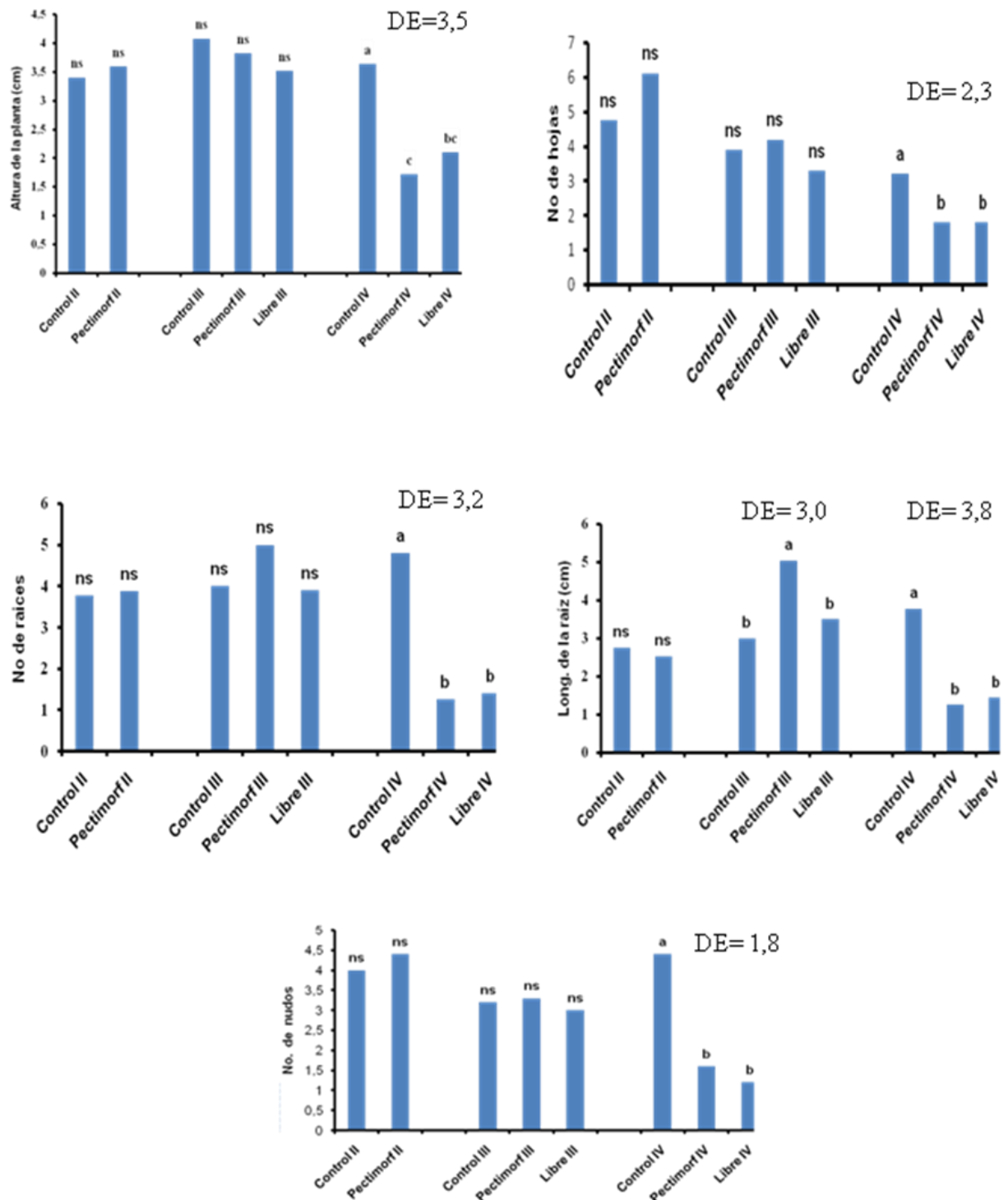


Figura 16. Efecto del Pectimorf® durante los subcultivos de yemas axilares de yuca, cultivar 'Señorita'. (I, II, III, IV- Número de subcultivos. **Medio Control**: 0,01 mg L⁻¹ ANA, **Pectimorf®**: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, **Libre**: sin reguladores del crecimiento) (DE Desviación Estándar).

Los resultados indican que, cuando se añadió reiteradamente Pectimorf® al medio de cultivo, los caracteres evaluados (altura de las plantas, número de las hojas, número de las raíces, longitud de las raíces y número de entrenudos), no superaron al tratamiento control, por tanto este debe emplearse solamente al inicio del proceso de multiplicación.

4.2.4 Aclimatización de vitroplantas

El análisis de la supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización se presenta en la figura 17. Se puede observar el comportamiento de las plantas a los 45 días, el mejor resultado fue el tratamiento 3 (plantas producidas en el medio con 10 mg L⁻¹ de Pectimorf®), el cual resultó significativamente superior al resto de los tratamientos en ambos cultivares (‘CMC-40’ y ‘Señorita’). Los menores valores se obtuvieron en el tratamiento 1, el cual correspondió al control sin asperjar.

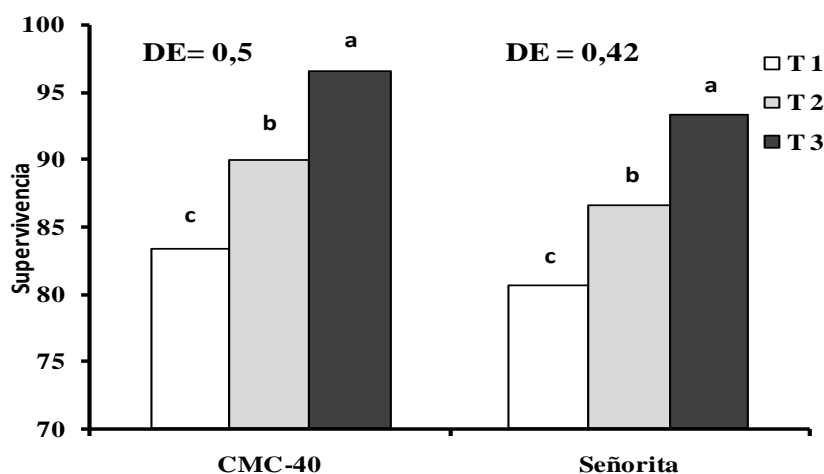


Figura 17. Efecto del Pectimorf® sobre la supervivencia de las plantas de yuca producidas *in vitro* a los 45 días en fase de aclimatización (n=20) (T1: Control (plantas provenientes del medio control 0,01 mg L⁻¹ ANA), T2: Control asperjado (1 mg L⁻¹ Pectimorf®), T3: plantas provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ Pectimorf®). (‘CMC-40’: DE 0,57**; ‘Señorita’: DE 0,75**). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan p≤ 0,05 (** significativo para p<0,01) (DE Desviación Estándar).

Se observó que el Pectimorf® posee un efecto residual sobre las plantas que se refleja en la fase de aclimatización y que hace posible que las mismas posean elevados niveles de supervivencia sin necesidad de una aplicación *ex vitro* del mismo, la cual ejerció un efecto depresivo de la misma, posiblemente debido a un efecto acumulativo de Pectimorf® en la planta.

Resultados similares se obtuvieron en la micropropagación del banano (*Musa spp*) cv. 'FHIA-18' al final de la fase de aclimatización, donde el porcentaje de supervivencia fue superior al 95 % en el tratamiento donde se empleo el Pectimorf®) (5 mg L⁻¹) en aspersión foliar e inmersión de las raíces de las vitroplantas y las características morfológicas de las mismas fueron superiores a las de las plantas provenientes del tratamiento control (Izquierdo, 2013).

Al analizar la altura de las plantas (Figura 18), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para ambos cultivares, el tratamiento 3 (plantas provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ de Pectimorf®) resultó significativamente superior al resto de los tratamientos tanto en 'CMC-40' como en 'Señorita', con 14,67 cm y 13,20 cm de altura respectivamente, seguido del tratamiento 2 (plantas asperjadas con 1 mg L⁻¹ de pectimorf®) con 11,00 cm para 'CMC-40' y para el cultivar 'Señorita' 10,00 cm. Los menores valores se obtuvieron en el tratamiento 1, el cual correspondió al control que contenía 0,01 mg L⁻¹ de ANA, donde la altura fue 7,54 cm en 'CMC- 40' y 7,92 cm para 'Señorita'.

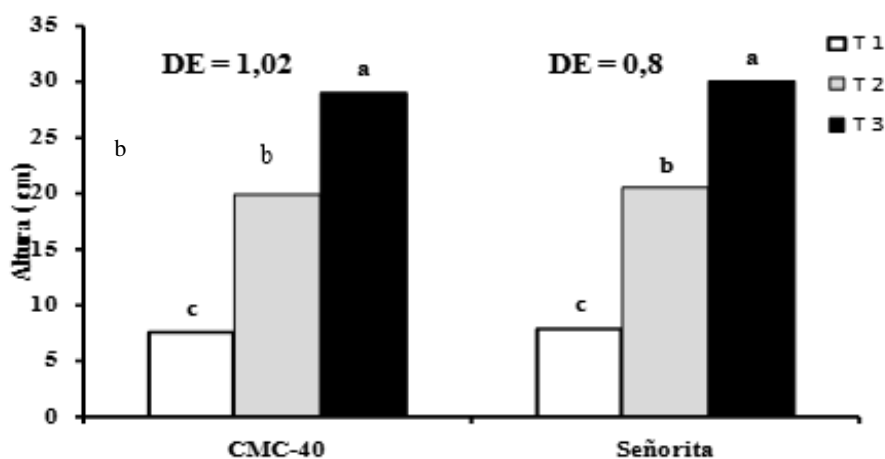


Figura 18. Efecto del Pectimorf® sobre la altura de las plantas de yuca a los 45 días después de la aclimatización (n=15) (T1: Control (plantas provenientes del medio control 0.01 mg L⁻¹ ANA), T2: Control asperjado (1 mg L⁻¹ Pectimorf®), T3: plantas provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ Pectimorf®). ('CMC-40': Altura 45 días, DE 0,54⁺⁺. 'Señorita': Altura 45 días, DE 0,50⁺⁺). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan p ≤ 0.05. (DE Desviación Estándar).

Al analizar la tasa de crecimiento de las plantas (Tabla 11), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para ambos cultivares, el tratamiento 3 (plantas provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ de Pectimorf®) resultó significativamente

superior al resto de los tratamientos tanto en 'CMC-40' como en 'Señorita', con valores de 0,21 cm/día y 0,18 cm/día respectivamente, seguido del tratamiento 2 (plantas asperjadas con 1 mg L⁻¹ de pectimorf®) con tasa de crecimiento de 0,13 cm/día para 'CMC-40' y para el cultivar 'Señorita' de 0,11 cm/día. Los menores valores de altura y tasa de crecimiento en ambos cultivares correspondieron al control que contenía 0,01 mg L⁻¹ de ANA sin asperjar.

Tabla 11. Efecto del Pectimorf® sobre las velocidades de crecimiento de las plantas de yuca a los 45 días después de la aclimatización (n=15) (**T1**: Control (plantas provenientes del medio control 0.01 mg L⁻¹ ANA), **T2**: Control asperjado (1 mg L⁻¹ Pectimorf®), **T3**: plantas provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ Pectimorf®).

Tratamientos	Tasas de crecimiento (cm/día)	
	'CMC-40'	'Señorita'
T1	0,06	0,06
T2	0,13	0,11
T3	0,21	0,18

Los resultados indican que el Pectimorf® ejerció un efecto residual favorable sobre la velocidad de crecimiento de las plantas lo que provocó que, a los 45 días la altura de las mismas resultara superior en las que provenían del medio con 10 mg L⁻¹ de éste y su efecto se mantuvo durante la aclimatización. La aspersión foliar incrementó también la velocidad de crecimiento de las plantas en relación al control, sin embargo, la magnitud del incremento fue inferior a T3.

La aspersión foliar reúne una serie de ventajas para el aporte de sustancias o elementos esenciales a la planta, encaminada a mejorar los procesos de absorción, transporte y transformación de los nutrientes en las hojas, los tallos o frutos (INFOJARDIN, 2011). Son varios los autores que utilizan sustancias de producción nacional por esta vía para estimular el crecimiento de las plantas (Álvarez, 2011, Borcioni y Bonato, 2012, Núñez *et al*, 2013), los cuales coinciden en conferirle una gran importancia a este aspecto.

Los resultados indican que a los 45 días, las plantas de ambos cultivares, provenientes del tratamiento 3, tuvieron una mayor altura producto de la velocidad de crecimiento inicial que fue mayor que en el resto de los tratamientos, lo cual

proporcionó una mejor adaptación a las condiciones *ex vitro* y que obedece, en su generalidad, a las reservas adquiridas durante la fase *in vitro*.

Por tanto, se podría incrementar la altura de las plantas al aplicar el Pectimorf® ya sea empleándolo en la fase *in vitro*, como por aspersiones foliares sobre las plántulas, ya que el mismo influyó positivamente en las diferentes variables morfológicas, lo cual pudiera deberse a lo planteado por El-Sharkawy en 2006, referente a una estimulación de la actividad fotosintética; por tanto, una mayor ganancia de esqueletos carbonados que pueden ser utilizados para la síntesis de nuevos compuestos. Resultados similares en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. 'Amalia', obtuvieron Ruíz *et al* (2009), al aplicar a plantas por aspersión foliar un grupo de reguladores cubanos en la fase de semillero y en la etapa de plantación del cultivo. Se demostró que existieron diferencias significativas en la altura y el número de hojas por planta, el mayor valor de altura (5.29 cm) se alcanzó cuando las plantas fueron asperjadas con 20 mg L⁻¹ de Pectimorf®.

Al analizar el diámetro del tallo, se observó un comportamiento similar en ambos cultivares (Figura 19). Los mayores valores correspondieron a los tratamientos 2 y 3, los cuales no difirieron estadísticamente entre ellos y sí con las plantas provenientes del tratamiento control.

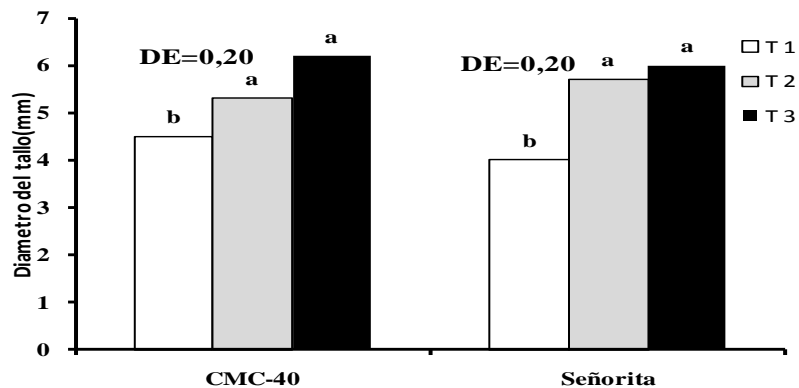


Figura 19. Efecto del Pectimorf® sobre el diámetro del tallo de plantas de yuca, a los 45 días de la aclimatización. (n=30) (T1: Control (vitroplantas provenientes del medio control ,01 mg L⁻¹ ANA), T2: Control asperjado (vitroplantas asperjadas con 1 mg L⁻¹ Pectimorf®), T3: vitroplantas provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ Pectimorf®). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan p≤ 0,05. (DE Desviación Estándar).

Los resultados anteriores coinciden con Izquierdo *et al.*, (2009), en la aclimatización de vitroplantas de bananos (*Musa spp*) cv. 'FHIA 18' (AAAB), el tratamiento que tuvo mayor diámetro del pseudotallo fue en las plantas tratadas con Pectimorf® (1 mg L⁻¹). En cuanto a la masa fresca de las plantas, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 12). En ambos cultivares, el mejor fue el tratamiento 3, correspondiente al tratamiento de las plantas que procedían del medio de cultivo con 10 mg L⁻¹ de Pectimorf®, el cual difirió significativamente del resto. El valor más bajo para este carácter se obtuvo en el tratamiento 1, que correspondió al control.

Tabla 12. Efecto del Pectimorf® sobre la producción de biomasa aérea y número de raíces engrosadas en plantas de yuca.

Tratamientos	CMC- 40			Señorita		
	M F (g)	MS (g)	RE	M F (g)	MS (g)	RE
T1	4,23 c	1,07 b	1,65 b	4,67 c	1,09 c	1,8 b
T2	31,56 b	12,05 a	1,0 b	32,55 b	7,64 b	1,0 b
T3	60,72 a	13,02 a	3,0 a	62,76 a	17,90 a	3,1 a
DE	1,00***	0,37**	0,52**	1,23***	0,67***	0,48**

MF: masa fresca aérea; MS: masa seca aérea; RE: raíces engrosadas; T1 (Control); T2 (Aspersión foliar 1 mg L⁻¹ Pectimorf®); T3 (Pectimorf® 10 mg L⁻¹)
Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$). (**significativo para $p < 0,01$; ***significativo para $p < 0,001$)(DE- Desviación Estándar).

La masa seca mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Para 'CMC-40' resultaron los tratamientos T3 y T2 los de mayores valores, con 13,02 g y 12,05 g, respectivamente, los cuales no difirieron estadísticamente entre sí. El valor más bajo para este carácter fue el tratamiento 1, el cual difirió del resto de los tratamientos. Para el cultivar 'Señorita' el tratamiento 3 fue superior al resto.

En estos indicadores, tanto masa fresca como masa seca en ambos cultivares, se obtuvieron los máximos valores en el tratamiento 3 (plantas provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), lo cual se corresponde con los resultados logrados en otros indicadores, como la altura y diámetro del tallo de las plantas.

Los oligogalacturónidos son efectivos en los procesos morfogénicos, tanto *in vitro* como *ex vitro*, pero la respuesta de los cultivos depende del tipo de oligogalacturónidos que se utilice, su concentración y su interacción con las

hormonas endógenas de los explantes (Izquierdo, 2009), lo cual se corrobora en estos resultados.

Si analizamos el número de raíces engrosadas, se puede decir que se observó igual efecto en ambos cultivares, fue mayor en las plántulas que provenían del tratamiento 3 donde se encontró presente Pectimorf[®], con diferencias significativas del resto de los tratamientos (T1 y T2), los cuales no difirieron estadísticamente entre si y mostraron los valores más bajos para este carácter. Es de destacar que este aspecto no se había informado con anterioridad en este cultivo.

Estos resultados indican que Pectimorf[®] no sólo favoreció el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que influyó en la acumulación de sustancias de reserva en la raíz, lo cual resulta muy favorable en este cultivo, ya que es este órgano el que se consume.

Álvarez *et al.*, (2011), emplearon semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.) cv. PS-9, las cuales sumergieron durante cuatro horas en una mezcla de oligogalacturónidos a una concentración de 10 mg L⁻¹ para comprobar el efecto del Pectimorf[®] sobre el desarrollo del sistema radical, como órgano más importante para el consumo. En el momento de la cosecha, se apreció un incremento de la longitud y diámetro del rizoma de las plantas tratadas, lo cual coincide con estos resultados.

Estos resultados demuestran el efecto estimulante de Pectimorf[®] sobre las variables relacionadas con el vigor de las plantas en la fase de aclimatización, lo cual permitió la supervivencia de las mismas al final de esta fase al elevar sustancialmente la eficiencia del proceso de micropropagación.

4.3 Estudios sobre la morfología y características genéticas de plantas de yuca obtenidas por micropropagación

4.3.1 Anatomía foliar y de las raíces de las plantas obtenidas

- **Anatomía foliar**

En la figura 20, se pueden observar los estomas de la lámina foliar abaxial de yuca, estos resultaron ser paracíticos o rubiáceos, con 2 células anexas dispuestas paralelamente con respecto a las oclusivas, la descripción realizada coincide con otros autores en igual cultivo (Oliveira *et al.*, 2012; Oliveira y Miglioranza, 2014).

Los mismos se encuentran distribuidos al azar y las células oclusivas mostraron una forma arriñonada, como es característico de las plantas dicotiledóneas (Taiz y Zeiger, 2006). Estas estructuras se pudieron observar tanto en la superficie abaxial como en la adaxial, por lo que se considera una especie anfiestomática. Se pudo apreciar una mayor frecuencia de aparición de estomas en la superficie abaxial (ABA) con respecto a la adaxial (ADA), resultados que coinciden con Ceballos y Cruz, (2002) y en el cultivo de la yuca.

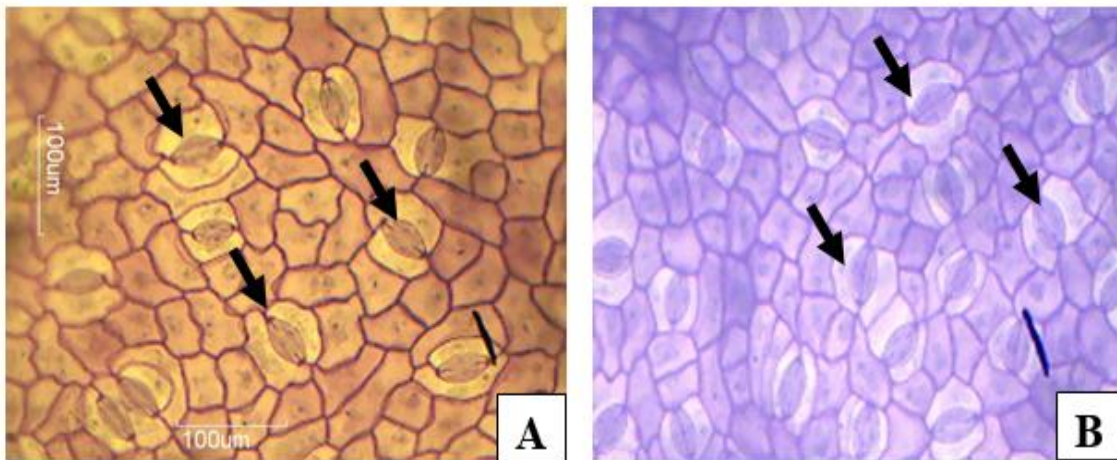


Figura 20. Fotomicrografía de la epidermis foliar de la superficie Abaxial de vitroplantas de yuca en 10 mg.L^{-1} de Pectimorf[®]. A- Cultivar 'CMC-40'. B- Cultivar 'Señorita'. Las flechas indican la presencia de estomas (400x).

En la tabla 13, se observan los resultados del análisis histológico de las hojas de vitroplantas de yuca al finalizar la fase de micropropagación. En sentido general, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en ambos cultivares. En 'CMC-40', el índice estomático de la cara abaxial en el tratamiento 2, alcanzó el máximo valor (19,42), siendo el valor más bajo para este carácter el tratamiento control (9,85), sin diferencias significativas con el tratamiento 8 ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA+ 15 mg L^{-1} de Pectimorf[®]), mientras que en la superficie adaxial, los máximos valores se encontraron en los tratamientos donde se empleó el producto en presencia de ANA (6, 7 y 8) sin diferencias significativas entre ellos pero si con el resto, excepto 6 que no difirió del 2. El valor más bajo fue el tratamiento 3 con diferencias significativas del resto. Se demostró que el Pectimorf[®] aumentó el índice estomático

en ambos cultivares, lo que pudo influir en la actividad fotosintética y el estado hídrico de las vitroplantas en su posterior aclimatización.

Tabla 13. Influencia de la aplicación del Pectimorf® sobre el índice estomático, longitud de los estomas y ancho de las células oclusivas del estoma de yuca, cultivares 'CMC- 40' y 'Señorita', al final de la fase *in vitro* (n=48).

T	Índice estomático		LE (µm)	ACO (µm)	Índice estomático		LE (µm)	ACO (µm)
	CMC-40				Señorita			
	ABA	ADA	ABA	ABA	ABA	ADA	ABA	ABA
1	9,85 c	1,13 c	109,41 a	29,10 b	12,02 c	0,68 cd	101,45 a	27,86 a
2	19,42 a	1,45 bc	99,47 ab	22,76 d	20,04 a	0,99 abc	86,35 d	18,22 e
3	12,41 b	0,41 d	95,31 bc	24,39 cd	16,44 ab	0,88 bcd	83,35 d	23,68 c
4	12,75 b	0,64 cd	78,57 d	25,49 c	14,23 bc	0,14 d	92,09 c	19,84 d
5	12,02 b	1,08 c	80,88 d	24,38 cd	17,51 ab	1,91 a	91,59 c	27,34 ab
6	12,14 b	2,20 ab	83,43 cd	33,33 a	16,77 ab	1,72 ab	93,59 bc	26,18 b
7	12,92b	2,31 a	89,40 bcd	27,85 b	18,80 a	1,54 abc	97,95 ab	27,74 a
8	9,89 c	2,96 a	87,82 bcd	29,06 b	12,06 c	1,35 abc	95,45 bc	27,59 ab
DE	6,04*	2,28**	23,35	7,94**	6,60**	1,71***	9,34***	5,90***

Leyenda: ADA: Superficie adaxial (haz); ABA: Superficie abaxial (envés); ANA: ácido naftalenacético
T: Tratamientos; LE: Longitud de los estomas; ACO: Ancho de las células oclusivas
(Tratamiento 1: Medio Control: 0.01 mg L⁻¹ ANA, Tratamiento 2: Control Absoluto: combinación (sin reguladores), Tratamiento 3: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, Tratamiento 4: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, Tratamiento 5: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, Tratamiento 6: Combinación (0.01 mg L⁻¹ ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), Tratamiento 7: Combinación (0.01 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), Tratamiento 8: Combinación (0.01 mg L⁻¹ ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®)) Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan p≤ 0.05. (* Significativo para p<0,1; **significativo para p<0,01; ***significativo para p<0,001) (DE Desviación Estándar).

En el cultivar 'Señorita', el índice estomático de la superficie abaxial alcanzó los mayores valores en los tratamientos 2 y 7, los cuales no difirieron significativamente entre sí y tampoco de los tratamientos 3, 5 y 6. Los valores más bajos para este carácter fueron 1, 4 y 8, correspondientes al tratamiento control, 10 mg L⁻¹ Pectimorf® y la combinación de 0,01 mg L⁻¹ ANA+ 15 mg L⁻¹ Pectimorf® respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, en la cara adaxial los tratamientos 5, 6, 7 y 8 no mostraron diferencias significativas entre ellos ni con 2. El valor más bajo fue en el tratamiento 4, el cual no difirió significativamente con 1 y 3. También

en el cultivar 'Señorita' la aplicación del Pectimorf® produjo un incremento del índice estomático.

El Pectimorf® aumentó el índice estomático y probablemente repercutió en el desarrollo de las vitroplantas en la fase de aclimatización al influir en la actividad fotosintética y evitar un exceso de transpiración, lo que se evidenció en la supervivencia de las vitroplantas en ambos cultivares de yuca.

Estos resultados coinciden con Altamura *et al.*, (1998), quienes señalaron que los tratamientos con mezclas de oligogalacturónidos biológicamente activos, modifican el tamaño de los estomas en explantes de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) desarrollados en medios de cultivo con concentraciones específicas de auxinas.

Al analizar longitud de los estomas (Tabla 13), en 'CMC-40' hubo diferencias significativas entre los tratamientos, los máximos valores estuvieron en 1 y 2 correspondientes al medio control y control absoluto, los cuales no difirieron significativamente entre ellos pero si del resto. El tratamiento 2 no difirió de 3, ni de donde se empleo el Pectimorf® en presencia de ANA (Tratamientos 6, 7 y 8). Se alcanzaron los menores valores en 4 y 5 correspondientes a las concentraciones 10 y 15 mg L⁻¹ Pectimorf® y sin ANA, sin diferencias significativas entre ellos. Estos resultados indican que el producto modificó la longitud de las células estomáticas, lo cual se traduce en que estomas más pequeños propician menos pérdida de agua por evapotranspiración y por ende una mejor supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización.

En el cultivar 'Señorita' también hubo diferencias significativas entre los tratamientos para este carácter (Tabla 13). Los estomas de mayor longitud fueron aquellos que se desarrollaron en los tratamientos 1 y 7, los cuales no difirieron estadísticamente entre sí pero si del resto. El tratamiento 7 tampoco difirió de los tratamientos 6 y 8 correspondientes a los medios donde se empleo el Pectimorf® en presencia de ANA. Se alcanzaron los valores más bajos para la longitud de los estomas en los tratamientos 2 y 3, correspondientes al medio sin reguladores y 5 mg L⁻¹ Pectimorf® (T3) sin diferencias significativas entre ellos. Al igual que en el cultivar 'CMC-40', los resultados indican que el producto también disminuyó la longitud de las células

estomáticas, lo cual facilita menos pérdida de agua, resultando de gran importancia en el proceso de aclimatización.

En cuanto al ancho de las células oclusivas en 'CMC-40' hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 13). El mejor tratamiento fue T6, el cual difirió significativamente del resto. El tratamiento control no difirió significativamente de 7 y 8 correspondientes a los medios donde se empleó el Pectimorf® en presencia de ANA. Los tratamientos 3, 4 y 5 no difirieron entre ellos y mostraron valores intermedios para este carácter y corresponden a los medios donde se añadió el producto como sustituto de ANA. En la tabla anterior se observa que el cultivar 'Señorita' hubo diferencias significativas pero contrario a lo sucedido en 'CMC-40', los tratamientos control, 5, 7 y 8 fueron superiores sin diferencias significativas entre ellos, correspondiente al medio control y donde se añadió 15 mg L⁻¹ de Pectimorf® en ausencia y presencia de ANA y 10 mg L⁻¹ de Pectimorf® en presencia de ANA, los cuales no difirieron de T6. Los valores más bajos de este carácter fueron para los tratamientos 2, 3 y 4, los cuales mostraron diferencias significativas entre ellos.

En ambos cultivares, los valores más bajos coinciden con la inclusión del Pectimorf® en el medio de cultivo, lo cual se traduce en la reducción del ancho de las células oclusivas, probablemente esta modificación contribuyó positivamente en la aclimatización de las plantas.

Si valoramos el tamaño de los estomas influenciado por la longitud y el ancho de las células guardianas en la superficie abaxial, podríamos decir que nuevamente el tratamiento 4 (10 mg L⁻¹ Pectimorf® como sustituto del ANA), al menos en estas condiciones de cultivo, en los cultivares 'CMC-40' y 'Señorita' provocó modificaciones en la estructura de las células guardianas, se mostraron más pequeñas en largo y ancho respecto al tratamiento control, esto pudo favorecer la etapa de aclimatización ya que se lograron plántulas más preparadas a las condiciones *ex vitro*, por consiguiente con posibilidades de estresarse menos al transitar hacia las nuevas condiciones de autotrofismo.

La morfología de los estomas juega un papel importante en el control de la pérdida de agua, lo cual permite adaptarse a muchas especies vegetales a condiciones ambientales muy diversas (Hetherington y Woodward 2003). La variación de las

características de los estomas podría desempeñar un papel importante en el proceso de aclimatación de una especie al ambiente.

Álvarez *et al.* (2012) lograron resultados similares en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L), al estudiar el efecto del Pectimorf® en la morfología y distribución de los estomas. Los resultados permitieron aseverar que la mezcla de oligogalacturónidos provocó modificaciones en la densidad estomática y tamaño de las células guardianas, en la superficie adaxial se observó diferencia en cuanto a la longitud de los estomas.

Por otra parte en la tabla 14, los resultados del análisis histológico en las hojas de las vitroplantas de yuca al finalizar la fase de aclimatización, también se manifestó que el empleo del Pectimorf® modificó algunos de los caracteres evaluados. En ambos cultivares, 'CMC-40' y 'Señorita', el índice estomático no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, modificó el tamaño de los estomas ya que alteró la longitud de los estomas con diferencias significativas respecto al control; en el cultivar 'CMC.40', la longitud promedio de los estomas fue de 240,84 μm y en 'Señorita' fue de 238,51 μm en las plantas *in vitro* provenientes del medio con 10 mg.L^{-1} Pectimorf®. El resto de los caracteres no mostraron diferencias significativas.

El tamaño de los estomas es un factor clave en el proceso de aclimatización, al existir una relación inversa entre el tamaño del estoma y la resistencia al estrés hídrico (Aasaman *et al.* 2001). Igual colectivo de autores comentan que el tamaño de los estomas y el índice estomático parecen ser las variables más sensibles al cambio en las condiciones ambientales, lo que evitaría el exceso de transpiración y permitiría una mejor adaptación de las plantas a condiciones de mayor demanda hídrica.

En este sentido, los resultados obtenidos indican que, al menos en estas condiciones, el Pectimorf®, modificó probablemente los patrones de desarrollo y distribución de los estomas en las plantas de yuca, donde el efecto se hizo más evidente cuando se añadió el producto al medio de cultivo, lo cual podría deberse a que las vitroplantas están sometidas a condiciones controladas y es una manera de evadir los efectos de la sustancia en estas condiciones *in vitro*.

Tabla 14. Influencia del Pectimorf[®] sobre el índice estomático, longitud de los estomas y ancho de las células oclusivas del estoma en hojas de plantas de yuca, con 35 días de la aclimatización (n= 12).

Tratamientos	Índice estomático		Longitud de los estomas (µm)	Ancho de las células oclusivas (µm)	Índice estomático		Longitud de los estomas (µm)	Ancho de las células oclusivas (µm)
	CMC-40				Señorita			
	ABA	ADA	ABA	ABA	ABA	ADA	ABA	ABA
1	18,37	0,14	224,22 b	64,65	16,70	0,35	227,56 b	63,71
2	18,92	0,14	240,84 a	64,85	17,38	0,32	238,51 a	63,00
DE	NS	NS	0,11***	NS	NS	NS	0,30***	NS

Leyenda: ADA: Superficie adaxial; ABA: Superficie abaxial; ANA: ácido naftalenacético

1: Control: plantas *in vitro* provenientes del medio control 0,01 mg L⁻¹ ANA, **2:** plantas *in vitro* provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ Pectimorf[®]. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Duncan $p \leq 0,05$. (***)Significativo para $p \leq 0,001$ (DE Desviación Estándar).

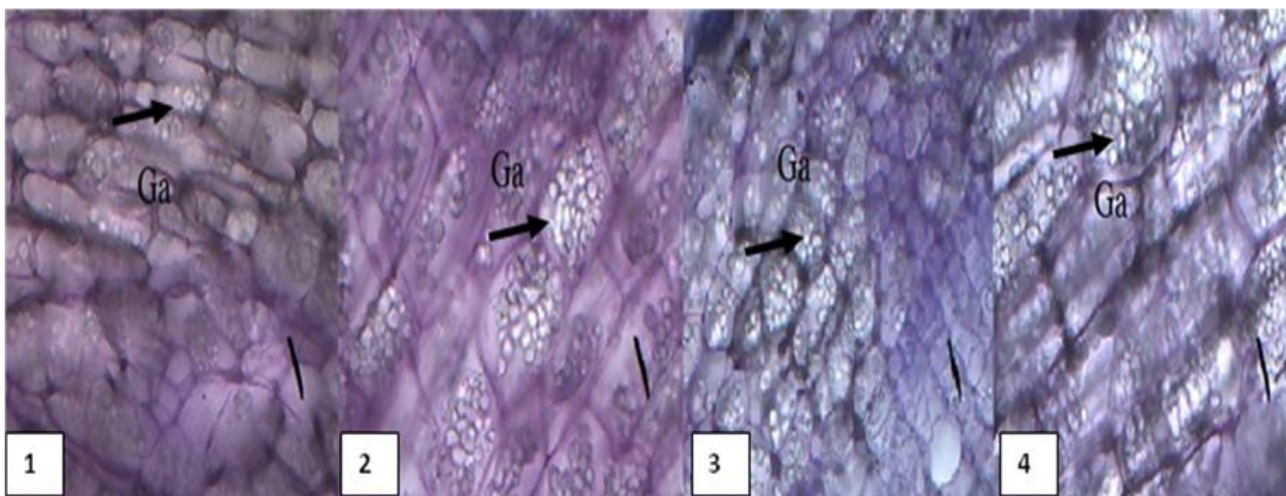
Se ha demostrado que los oligogalacturónidos afectan el crecimiento y desarrollo de los órganos y células vegetales (Bellicampi *et al.*, 2011) y la diferenciación de estomas y células del periciclo (Yin *et al.*, 2006).

Estos resultados indican que Pectimorf[®] no solo favoreció los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas durante la fase *in vitro*, lo que permitió la obtención de plantas mas vigorosas, sino que influyó además en el tamaño de los estomas, lo cual permite a la planta una menor evapotranspiración durante la aclimatización y con ello elevó el índice de supervivencia, lo cual se informa por primera vez para este cultivo. Hasta el momento no existen informes en la literatura consultada sobre el posible papel que pueda desempeñar el Pectimorf[®] u otros oligos en la histología de las plantas de yuca.

Estos resultados constituyen el punto de partida de investigaciones futuras, para profundizar en los efectos que pueda tener esta sustancia en la histología de las plantas y profundizar en los mecanismos de acción de esta mezcla de oligogalacturónidos para lograr determinar cuáles son realmente las vías por las que ejerce su acción.

- **Anatomía de las raíces**

En los tratamientos con Pectimorf[®], se observó la presencia de raíces engrosadas y al realizar el corte histológico de las mismas, se evidenció en ambos cultivares granos de almidón con forma de estructura redondeada o esféricos y de tamaño desigual (Figura 21).



Ga: Granos de almidón (100x)

Figura 21. Fotomicrofotografía de corte transversal de raíces de plántulas de yuca. Cultivar 'CMC-40': control (1) y provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ Pectimorf[®] (2). Cultivar 'Señorita': control (3) y provenientes del medio con 10 mg L⁻¹ Pectimorf[®] (4). Las flechas indican la presencia de granos de almidón en las células.

Estos resultados coinciden con lo informado en la literatura (Cereda, 2000; Hoover, 2002; Alvis *et al.*, 2008), quienes además señalaron que la estructura típica del almidón en papa (*Solanum tuberosum* L.) tiene forma ovoide y en el ñame (*Dioscorea* spp) su forma es lenticular.

En ambos cultivares, la presencia de Pectimorf[®] aumentó el número de granos de almidón presentes en las células. Los granos de almidón en las raíces de yuca juegan un importante papel en la reserva de energía de la planta.

Partiendo de que la yuca tiene su principal valor económico en su órgano de reserva o almacenamiento de energía, las raíces, y sus diversos usos en la alimentación humana y animal, los resultados antes expuestos son muy importantes; ya que el Pectimorf[®] produjo un efecto positivo sobre la acumulación de almidón, aumentando el grosor de las raíces en este cultivo.

4.3.2 Número cromosómico en ápices radiculares de plantas

Las plantas que se obtienen por el empleo del cultivo *in vitro* resulta de gran importancia el estudio del número cromosómico, ya que permite en etapas tempranas de la micropropagación, comprobar si existe o no variabilidad en este sentido del material propagado.

En los cultivares analizados y para los diferentes tratamientos, se pudo comprobar que se mantuvo la condición diploide, con la presencia de $2n=2x=36$ cromosomas, lo que es característico de esta especie, se comprobó que al emplear el Pectimorf® no se produjeron cambios en el número de cromosomas; lo cual denota la no influencia de este producto sobre el nivel de ploidía de las células (Figura 22). Hasta el momento, no existen informes en la literatura consultada sobre este tema en yuca.



Figura 22. Célula en división de vitroplantas de yuca en los cultivares de yuca, en medios controles y con Pectimorf®, número de cromosomas $2n=2x=36$ (1 000x) ($n=20$).

Martínez *et al.*, (2005) y Castilla *et al.*, (2009), señalaron que el número de cromosomas permite la verificación de la estabilidad genética en plantas propagadas mediante el cultivo de tejidos *in vitro*, que podría ocasionar alteraciones del material hereditario y permite, en etapas tempranas de la micropropagación de una especie, comprobar si existe o no variabilidad en cuanto al número cromosómico.

Según Beovides (2001) y Xiques (2002), los estudios en este campo se relacionan, principalmente, con el análisis de divisiones meióticas y mitóticas, las variaciones cromosómicas estructurales y numéricas, el análisis de la ploidía, así como la determinación del número cromosómico mediante el estudio de cariotipo.

Los resultados demostraron que Pectimorf® no produjo cambios en el número de cromosomas; lo que denota la no influencia de este producto sobre el nivel de ploidía de las células, estos son de gran importancia, ya que hasta el momento no existen informes en la literatura consultada sobre la acción o efecto de los oligogalacturónidos sobre el número cromosómico en yuca.

4.3.3 Estudios isoenzimáticos del material propagado

Los sistemas isoenzimáticos peroxidadas (Prx), esterasas (Est), anhidrasa carbónica (AC), fosfatasas ácidas (FAc) y polifenoloxidasas (PPO), no presentaron diferencias en los patrones de bandas para los diferentes tratamientos estudiados (Figuras 23, 24, 25, 26 y 27). Estos patrones resultaron ser monomórficos, ya que todas las bandas fueron comunes en posición e intensidad en todos los tratamientos en estudio, sin embargo se apreciaron diferencias en los patrones entre los cultivares estudiados.

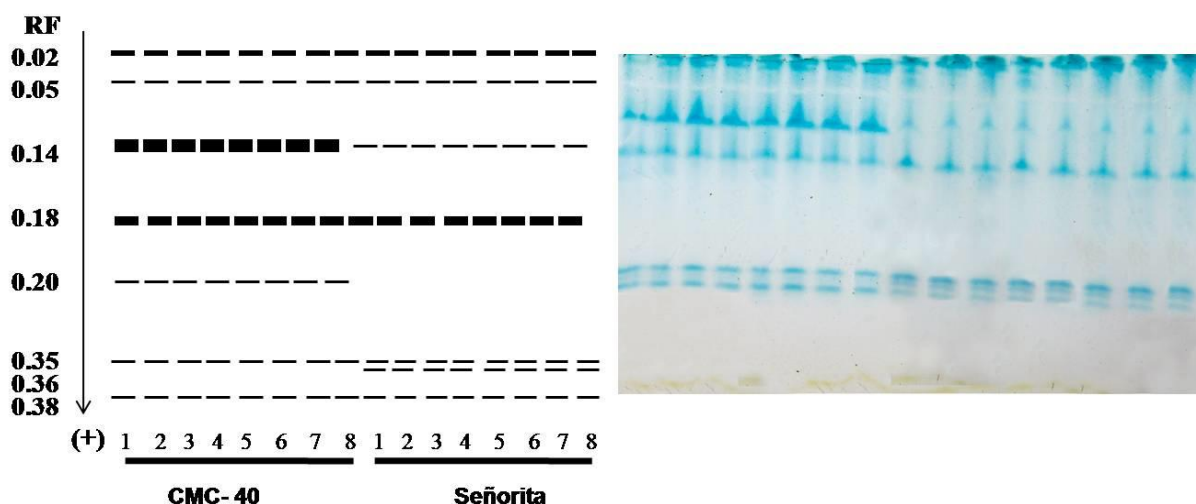


Figura 23. Zimograma de peroxidadas (Prx)

Leyenda: 1- Medio Control: 0,01 mg L⁻¹ ANA, 2- Medio 1: Control Absoluto (sin reguladores del crecimiento), 3- Medio 2: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, 4- Medio 3: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, 5- Medio 4: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, 6- Medio 5: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), 7- Medio 6: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), 8- Medio 7: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®).

El sistema peroxidadas (Figura 23) resultó monomórfico en cada cultivar, y mostró un total de 7 bandas. No se presentaron diferencias en el número e intensidad de las bandas para los diferentes tratamientos estudiados, pero si se apreciaron ligeras

diferencias en los patrones entre los cultivares. El cultivar 'CMC-40' presentó una banda distintiva con Rf 0,20, así como mayor intensidad de tinción de la tercera banda (Rf 0,14), mientras que 'Señorita' no mostró la banda de 0,20 Rf y sí una banda de muy ligera intensidad con un Rf 0,36 que no apareció en 'CMC-40'.

En trabajos realizados por González (2002), con el objetivo de detectar la posible variabilidad genética inducida por las técnicas del cultivo *in vitro* en la yuca, encontraron pequeñas diferencias en los patrones electroforéticos para el sistema isoenzimático peroxidasas en el cultivo de meristemos y la embriogénesis somática, por ejemplo, en el caso del cultivar 'CMC-76', el zimograma mostró siete bandas en total, que estaban presentes en las plantas obtenidas por embriogénesis somática y cuatro de ellas aparecieron en el resto del material, sin embargo, los resultados demuestran estabilidad del material y diferencias entre los cultivares estudiados, este sistema podría emplearse como marcador genético para diferenciar cultivares de yuca.

Las peroxidasas son un grupo de isoenzimas con participación activa en la lignificación de la pared celular y la regulación de los niveles de auxina, además, pueden relacionarse con el desarrollo de otros estados fisiológicos en las plantas (González, 2002).

Las isoenzimas peroxidasas intervienen en la biosíntesis de los componentes de la pared celular y la diferenciación celular. Son consideradas marcadores bioquímicos importantes de la morfogénesis y se han empleado para estudiar el efecto de oligosacarinas y brasinoesteroides en otros cultivos (Castillo *et al.*, 2010).

Por otra parte, en vitroplantas de mandarina 'Cleopatra' (*Citrus reshni Hort. ex Tan.*) tratadas con el Pectimorf[®], apareció la inhibición de isoformas, en lugar de la inducción, lo cual pudo deberse a la inducción de vías diferentes de defensa que no involucran procesos de oxidación reducción de derivados fenólicos (Hernández *et al.*, 2007).

En estudio de afinidades genéticas en especies silvestres del género *Nicotiana*, las isoenzimas peroxidasas mostraron un total de 12 bandas, todas ellas polimórficas. Este sistema permite caracterizar cada especie de este género, ya que cada una constituye un zimotipo propio (Valdés *et al.*, 2010). En el cultivo de la yuca sucedió lo

mismo este sistema permitió detectar diferencias polimórficas entre los cultivares 'CMC-40' y 'Señorita'.

Los resultados corresponden con otros autores, quienes han informado en otras especies vegetales un marcado polimorfismo para este sistema (Lara *et al.*, 2003; Castilla *et al.*, 2014; Kessel *et al.*, 2014). Las peroxidadas son las enzimas más utilizadas como marcador genético en la identificación del genoma en plantas, como es el caso del género *Musa*, donde se han podido detectar diferencias entre especies y cultivares de bananos (Román, 2004; Román *et al.*, 2004).

En nuestro caso, determinó que este sistema no presentó alteraciones con los diferentes tratamientos aplicados, mostrando estabilidad y podría emplearse como marcador genético en la identificación de los cultivares de yuca estudiados.

En el sistema esterases (Figura 24), se encontró un total de nueve bandas, de las cuales ocho fueron comunes en posición e intensidad para los tratamientos en ambos cultivares; sin embargo, se observó una banda más con Rf 0,26 para el cultivar 'CMC-40'. Este sistema fue monomórfico, ya que todos los tratamientos evaluados presentaron igual posición, número e intensidad de bandas en ambos cultivares.

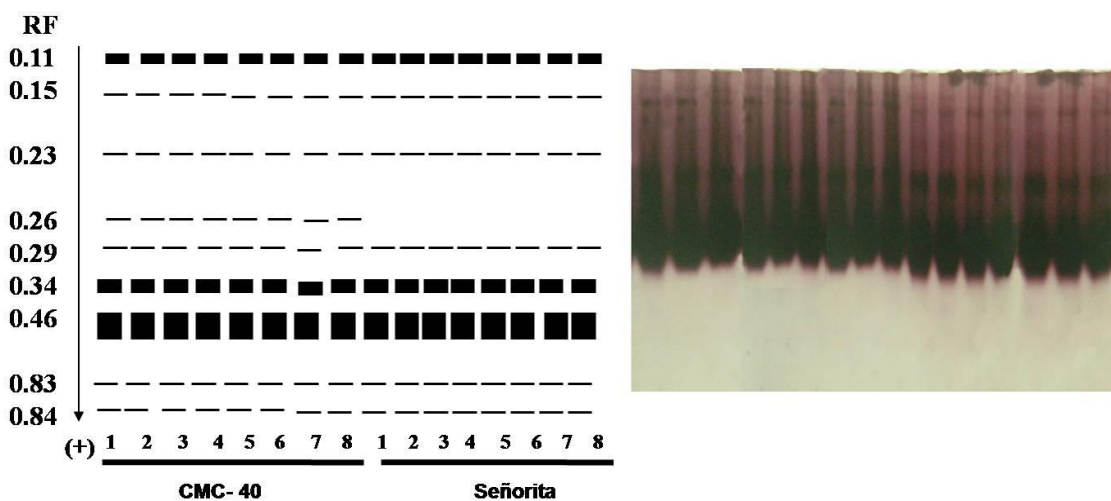


Figura 24. Zimograma de Esterases (Est)

Leyenda: 1- Medio Control: 0,01 mg L⁻¹ ANA, 2- Medio 1: Control Absoluto (sin reguladores del crecimiento), 3- Medio 2: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, 4- Medio 3: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, 5- Medio 4: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, 6- Medio 5: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), 7- Medio 6: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), 8- Medio 7: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®).

Son numerosos los autores que utilizan este sistema isoenzimático en la caracterización de la variabilidad del material propagado, en cultivos como yuca (*Manihot esculenta* C.) (Beovides, 2001), en el género *Eucalyptus spp.* (Geada, 2003), en el género *Solanum* (Castillo *et al.*, 2010), el género *Musa* (Román *et al.*, 2004; Dueñas, 2005), en mandarina 'Cleopatra' (*Citrus reshni* Hort ex Tan) (Hernández *et al.*, 2007), en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Lara *et al.*, 2003) y fresa (*Fragaria ananassa*) (Kessel *et al.*, 2014).

Según Castillo *et al.* (2010), las esterases son isoenzimas que juegan un importante papel en los procesos fotosintéticos de las plantas y su estabilidad en la expresión enzimática les confiere gran importancia en estudios genéticos, por ello son utilizadas para estudiar los diferentes estadios de desarrollo. En este caso, la adición de la mezcla de oligogalacturonidos en el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yuca, no afectó la estabilidad genética en ambos genotipos.

Como se aprecia en la figura 25, el sistema anhidrasa carbónica mostró un total de cinco bandas, de las cuales cuatro fueron comunes en posición, número e intensidad para los tratamientos empleados en ambos cultivares; sin embargo, se observó una banda distintiva para el cultivar 'Señorita' con Rf de 0,19. Este sistema resultó monomórfico para ambos cultivares y los tratamientos que se emplearon.

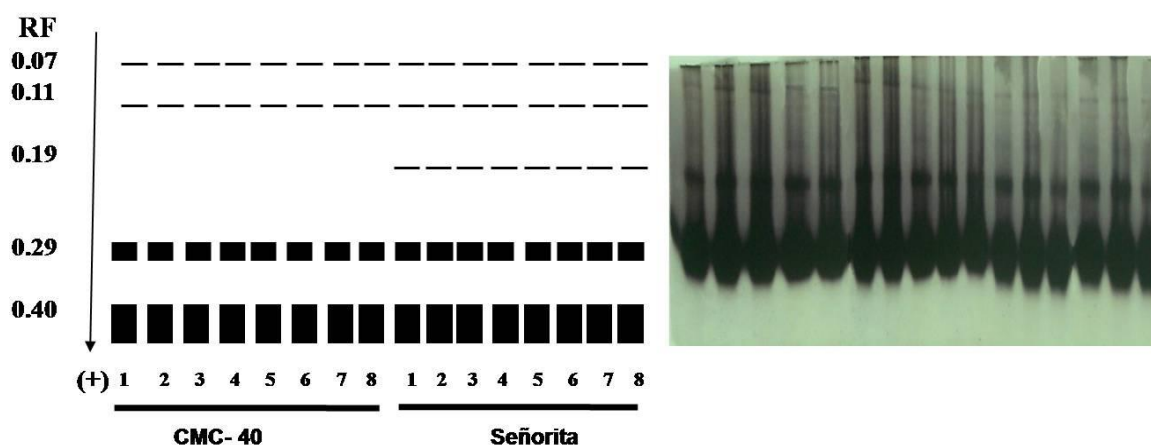


Figura 25. Zimograma de Anhidrasa Carbónica (AC)

Leyenda: 1- Medio Control: 0,01 mg L⁻¹ ANA, 2- Medio 1: Control Absoluto (sin reguladores del crecimiento), 3- Medio 2: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, 4- Medio 3: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, 5- Medio 4: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, 6- Medio 5: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), 7- Medio 6: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), 8- Medio 7: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®).

Los resultados coinciden con González (2002), quien no encontró diferencias en este patrón electroforético al evaluar diferentes materiales de yuca, con el objetivo de detectar la posible variabilidad genética inducida por las técnicas del cultivo *in vitro*. Trabajos realizados en tomate *Solanum lycopersicom* L. (Florida *et al.*, 2002) mostraron muy poca variabilidad para estas isoenzimas.

Como se aprecia en la figura 26, en el sistema fosfatasas ácidas se encontró un total de siete bandas y cuatro fueron comunes en posición, número e intensidad para los tratamientos empleados en ambos cultivares; sin embargo en el cultivar 'Señorita' se observó la ausencia de dos bandas (Rf 0,12 y Rf 0,20) y la banda 6 de Rf 0,14, mostró menor intensidad. Este sistema no reflejó variaciones en el número e intensidad de las bandas en relación con los tratamientos aplicados; lo que demuestra que el Pectimorf® no produjo ningún cambio sobre este sistema en ninguno de los cultivares estudiados.

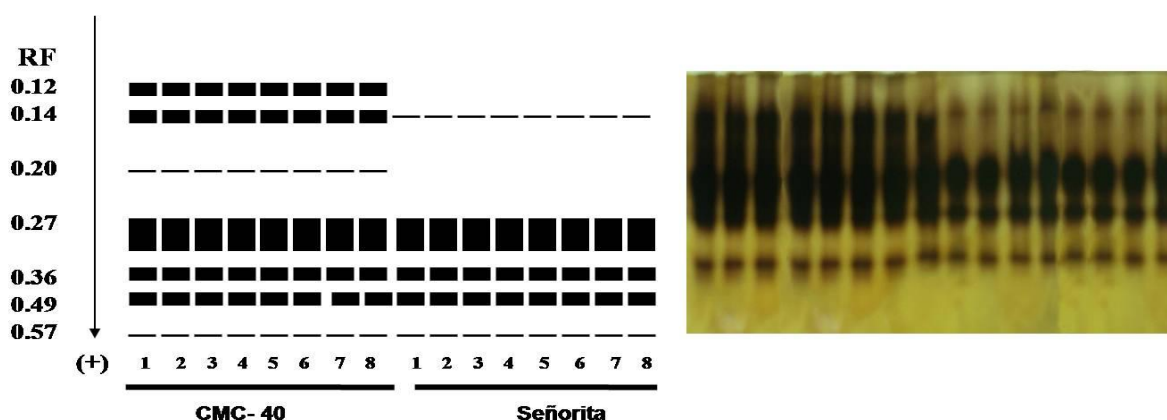


Figura 26. Zimograma de Fosfatasas ácidas (FAC).

Leyenda: 1- Medio Control: 0,01 mg L⁻¹ ANA, 2- Medio 1: Control Absoluto (sin reguladores del crecimiento), 3- Medio 2: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, 4- Medio 3: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, 5- Medio 4: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, 6- Medio 5: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), 7- Medio 6: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), 8- Medio 7: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®).

Los resultados obtenidos coinciden con González (2002), quien informó que las isoenzimas fosfatasas ácidas fueron monomórficas en estudios de variabilidad genética en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* C.). Por otra parte, Román (2004) encontró muy poco polimorfismo en este sistema al estudiar un grupo de cultivares de plátanos (subgrupo AAB).

En el sistema isoenzimático polifenoloxidasas (Figura 27), se encontraron un total de seis bandas, todas fueron comunes en posición, número e intensidad para los tratamientos empleados en ambos cultivares. Este sistema presentó un marcado monomorfismo, lo cual presume que no haya efectos negativos del Pectimorf® sobre la estabilidad del material propagado ni entre los cultivares estudiados.

Los resultados no coinciden con Valdés *et al.* (2003), quienes encontraron para este sistema (PPO) igual número de bandas totales (6) al determinar las afinidades genéticas entre 12 cultivares de yuca de importancia económica para Cuba y permitió identificar diferencias entre los cultivares ‘CMC-40’ y ‘Señorita’. Las diferencias encontradas con nuestros resultados, 7 y 5 bandas totales para ‘CMC-40’ y ‘Señorita’ respectivamente, podrían deberse a la época, edad de las plantas y condiciones de cultivo establecidas en ambas investigaciones, ya que las isoenzimas son marcadores de expresión génica, que están influidas por las condiciones ambientales.

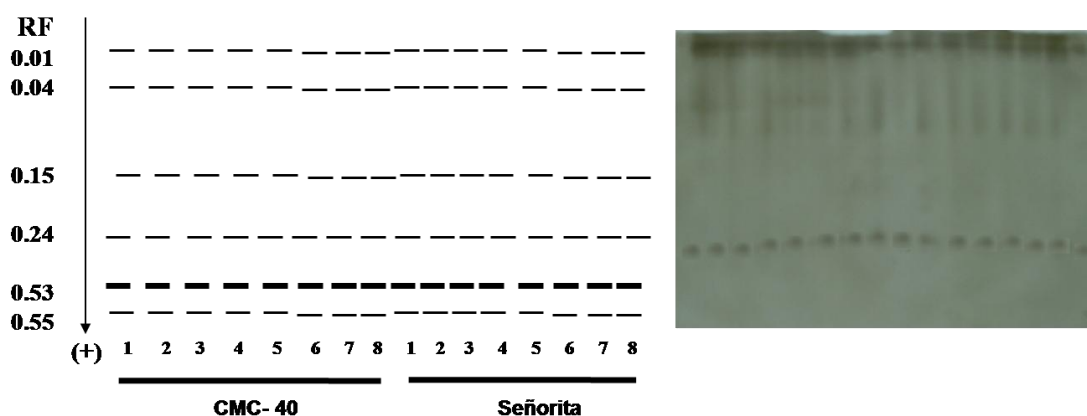


Figura 27. Zimograma de Polifenoloxidasas (Ppo)

Leyenda: 1- Medio Control: 0,01 mg L⁻¹ ANA, 2- Medio 1: Control Absoluto (sin reguladores del crecimiento), 3- Medio 2: 5 mg L⁻¹ Pectimorf®, 4- Medio 3: 10 mg L⁻¹ Pectimorf®, 5- Medio 4: 15 mg L⁻¹ Pectimorf®, 6- Medio 5: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 5 mg L⁻¹ Pectimorf®), 7- Medio 6: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ Pectimorf®), 8- Medio 7: (0,01 mg L⁻¹ ANA + 15 mg L⁻¹ Pectimorf®).

Las Polifenoloxidasas en las plantas, participan en la defensa y biosíntesis de los fenilpropanoides, regulación del oxígeno plastídico y en el transporte de electrones (Valdés *et al.*, (2003). Estudios por otros autores en bancos de germoplasma cubanos de diferentes cultivos de reproducción agámica, coincidieron en plantear que existe polimorfismo para el sistema polifenoloxidasas, por ejemplo en cultivares

del banco de germoplasma de yuca (Milian *et al.*, 2000) y en el banco de germoplasma de *Colocasia esculenta* L. Schot (Rodríguez *et al.*, 2001).

Medina *et al.*, (2003), realizaron estudios de estabilidad genética en plantas de yuca regeneradas a partir de embriones somáticos comparados con la organogénesis como control, y concluyeron que el número cromosómico y los zimogramas de ocho sistemas izoenzimáticos permanecieron estables. Los estudios previos respecto a la estabilidad de plantas de yuca regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática, han revelado que son estables. Los ligeros cambios encontrados en algunos caracteres cualitativos, mostraron poseer un origen epigenético, debido a modificaciones de procesos fisiológicos durante el transcurso y que tan pronto las plantas retornan a las condiciones normales de cultivo, estas variaciones desaparecen (Raemakers *et al.*, 1995).

El monomorfismo presente en los sistemas isoenzimáticos estudiados en los diferentes tratamientos, indican que el Pectimorf® no ejerció ningún efecto sobre la expresión de los genes asociados a la producción de isoformas, al menos a este nivel de expresión.

La anterior confirmación constituye un resultado novedoso y de gran valor práctico que garantizará la estabilidad del material de plantación que se produzca con el empleo del Pectimorf®.

4.3.4 Análisis de marcadores RADP en plantas micropropagadas de yuca

Todos los iniciadores amplificaron en cantidad, calidad y reproducibilidad las bandas. Los más informativos fueron el UBC- 256 con 6 bandas para cada cultivar, para un total de 12 bandas, seguido del UBC-270 con 7 bandas para el cultivar 'CMC-40' y siete bandas para el cultivar 'Señorita'. El UBC-240 fue el que menos bandas amplificó con un total de tres en el cultivar 'CMC-40' y cuatro en 'Señorita' (Tabla 15 y Figura 28). Los ocho iniciadores de secuencia arbitraria que se utilizaron fueron capaces de amplificar 77 bandas en un rango general de 500- 1 500 pb, para un promedio de 10 bandas por iniciador aproximadamente. Todos los patrones fueron iguales en todos los tratatamientos en ambos cultivares.

Tabla 15. Número total de bandas monomórficas detectadas con cada iniciador en vitroplantas de yuca, provenientes del 2^{do} subcultivo (n=3)

Iniciador	Total de bandas detectadas por Iniciador				Total de Bandas Monomórficas		Porcentaje de Bandas Monomórficas	
	Cultivares				Cultivares		Cultivares	
	CMC-40		Señorita					
	Control	Pectimorf®	Control	Pectimorf®				
UBC-240	3	3	4	4	3	4	100 %	100 %
UBC-256	6	6	6	6	6	6	100 %	100 %
UBC-259	4	4	7	7	4	7	100 %	100 %
UBC-262	5	5	4	4	5	4	100 %	100 %
UBC-268	4	4	7	7	4	7	100 %	100 %
UBC-270	7	7	6	6	7	6	100 %	100 %
UBC-277	2	2	5	5	2	5	100 %	100 %
UBC-284	3	3	4	4	3	4	100 %	100 %

n- total de repeticiones del experimento

La utilización de técnicas moleculares ha permitido complementar la información obtenida a través de la caracterización morfológica e isoenzimática. Entre las técnicas de marcadores moleculares más usadas para caracterizar y evaluar la variabilidad genética existente en los bancos de germoplasma se encuentra la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), que tiene la gran ventaja de ser utilizada sin previo conocimiento del genoma (Soumen *et al.*, 2012, Chhipi Shrestha *et al.*, 2013).

En yuca esta técnica ha sido utilizada junto a los RFLPs y microsatélites para desarrollar su mapa genético (Supajit *et al.*, 2011, Olasanmi *et al.*, 2014, Kyaligonza *et al.*, 2014), así mismo, los RAPDs han sido usados para el estudio de la diversidad genética de pequeños grupos de germoplasma y para establecer las relaciones entre la yuca y especies silvestres relacionadas (Zambrano *et al.*, 2003, Rimoldi *et al.*, 2010).

En el cultivar de plátano 'Nanjanagudu Rasabale'(AAB) se encontró que de los 50 iniciadores que se analizaron por la técnica de RAPD, todas las bandas eran monomórficas y que no había variabilidad genética entre las plántulas que se analizaron cuando se obtuvieron en un medio modificado con 6-BAP (22,4 µM) y Kinetina (4,65 µM) (Venkatachalam *et al.*, 2007). También González *et al.*, (2007) obtuvieron un 100% de monomorfismo en plantas de boniato (*Ipomea batata* L.), cv.

En *Curcuma longa* L. cuando se emplearon explantes de bulbos de rizomas para el establecimiento *in vitro* se demostró homogeneidad genética en los propágulos que se regeneraron en comparación con las plantas madres cuando se realizó el análisis mediante RAPD (Tyagi *et al.*, 2007).

En yuca (*Manihot esculenta*), los estudios moleculares con RAPD se han empleado en el mapeo genético de cultivares de interés comercial y en la identificación de cultivares (Asante y Offei, 2003; Zacarias *et al.*, 2004; Rimoldi *et al.*, 2010). Así mismo, Fernando *et al.*, 1996 informaron que no hubo estabilidad genética en accesiones de yuca provenientes del banco de germoplasma del CIAT después de 10 años conservadas *in vitro*, al emplear marcadores moleculares como AFLP y RAPD.

En el cultivo de la yuca, no existen reportes sobre estudios de monitoreo de la variabilidad genética cuando se emplea en la organogénesis Pectimorf[®], aspecto muy importante, ya que las técnicas de cultivo de tejidos vegetales requieren como análisis complementarios los estudios de estabilidad genética del material vegetal generado a fin de garantizar su identidad genética.

Los resultados de la presente investigación, constituyen un aporte científico y práctico, para la micropropagación de la yuca, ya que posibilita modificar los protocolos empleados para ello con la incorporación de un producto cubano, que permite la obtención de vitroplantas más vigorosas, con elevados porcentajes de supervivencia durante la aclimatización y estabilidad del material obtenido. Por ello, se propone una modificación al protocolo empleado (Figura 29). Esta nueva metodología puede ser usada como alternativa para la propagación masiva en la obtención de material de alta calidad en los cultivares de yuca 'CMC-40' y 'Señorita'.

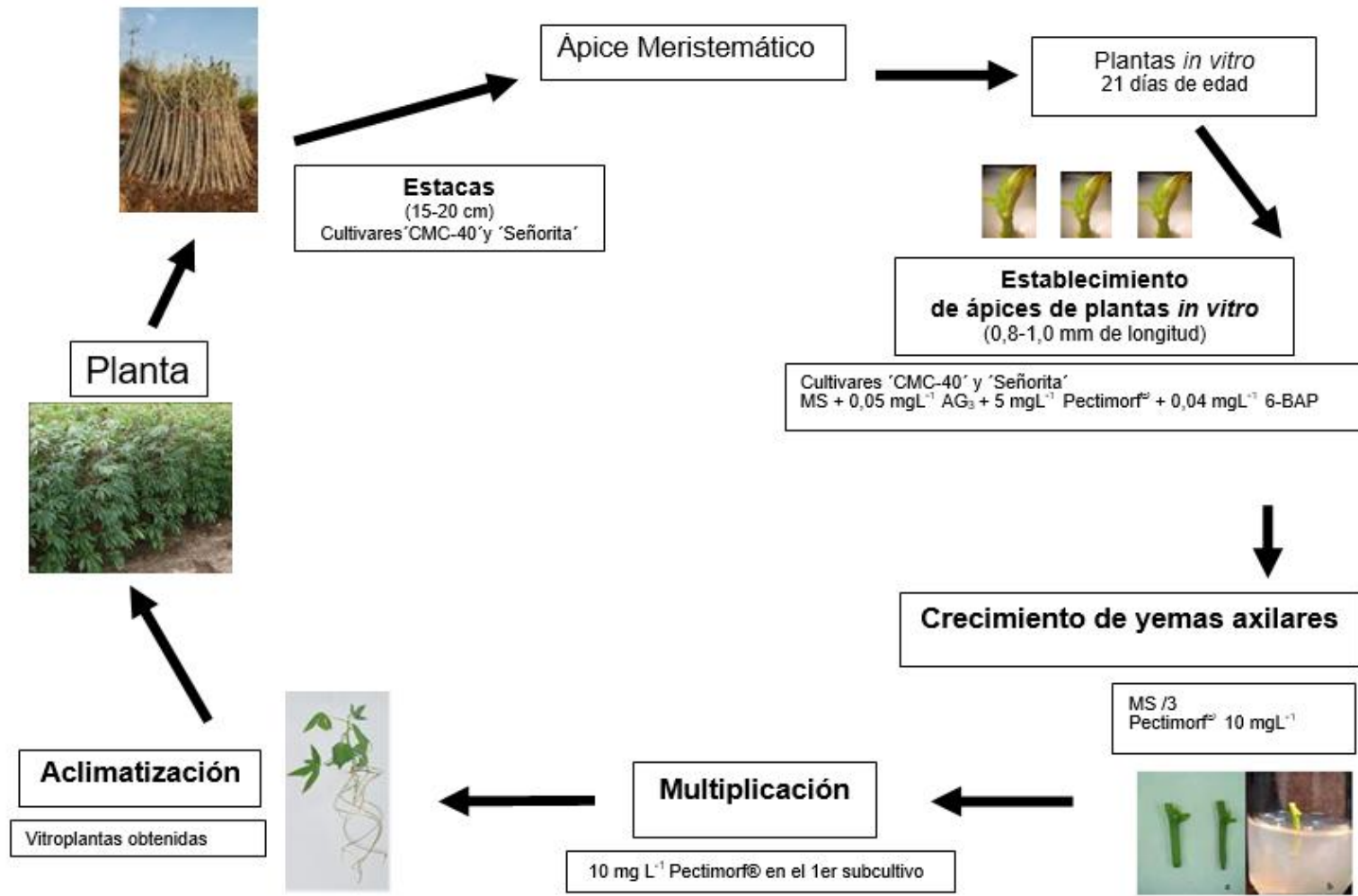


Figura 29. Modificaciones propuestas a la metodología para la propagación *in vitro* de la yuca, cultivares 'CMC-40' y 'Señorita'



CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

1. Pectimorf[®] ejerció una acción inhibitoria sobre los genes *SAUR-16* e *IAA-5* que codifican la expresión de auxinas, siendo esta mas marcada sobre *SAUR-16*.
2. Se evidenció una acción favorable de Pectimorf[®] sobre las variables del crecimiento evaluadas sobre ápices y yemas de dos cultivares de yuca 'CMC-40' y 'Señorita'. durante el proceso de micropropagación, así como su efecto residual durante el período de aclimatización en ambos cultivares.
3. En ambos cultivares, el empleo de Pectimorf[®] a una concentración de 5 mg L⁻¹ en sustitución de ANA en los medios de cultivo para el crecimiento de ápices, brindó resultados similares al medio control.
4. En la fase de multiplicación (yemas axilares) el empleo de Pectimorf[®] a 10 mg L⁻¹ en ambos cultivares resultó adecuado, obteniéndose resultados superiores al medio control con 0,01 mg L⁻¹ de ANA.
5. Se comprobó el efecto residual de Pectimorf[®] sobre las vitroplantas, lo cual se manifestó por un aumento en la tasa de crecimiento de las mismas, así como algunos cambios en la anatomía de las hojas, que provocaron un mayor porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatización.
6. De acuerdo al análisis realizado, Pectimorf[®] no produjo cambios en las características genéticas de las plantas micropropagadas.



CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

6 RECOMENDACIONES

1. Aplicar el protocolo propuesto para la micropropagación de la yuca en los cultivares 'CMC-40' y 'Señorita'.
2. Proponer extender los resultados de este estudio al resto de los cultivares comerciales de yuca (*Manihot esculenta* C.), que se encuentran en fase de generalización en el país.
3. Evaluar el efecto del Pectimorf® a nivel de campo, al concluir el ciclo productivo de las plantas.
4. Incluir los resultados del documento en los programas de estudios de pre y postgrado de las carreras de Agronomía y Ciencias Biológicas.



CAPÍTULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aasaman K., Sober A. y Rahi M. 2001. Leaf anatomical characteristic associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 765-774.
2. AGRO2. 2014. Consultado: 24 /mayo/2014.]. Disponible en: <http://www.agro2.com/es/la-yuca/usos-de-la-yuca/>
3. Albarrán J. F. y Fuchs M. 2003. Propagación clonal rápida de variedades comerciales de yuca mediante técnicas biotecnológicas. Seminarios CENIAP. Maracay, Aragua, Venezuela. [Consultado: 14 /mayo/2004.]. Disponible en: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/texto/albaran.htm.
4. Albarrán J. F.; Fuenmayor F.; Fuchs M.; Martínez G.; Rodríguez A.; Manzanilla E.; Díaz E.; León R.; Torrealba M. 2011. Biotechnological strategies for germoplasm conservation in the INIA-CENIAP, Venezuela. Case: cassava and musa. *Agronomía Trop.* 61(1): 85-94.
5. Allem A.C. 1995. The evolutionary relationships of Brazilian *Manihot* (*Euphorbiaceae*). En: Lecture delivered at the «*Manihot* taxonomy and conservation workshop». Memories. CIAT, Cali, Colombia, 7-11. November, 15 p.
6. Alonso J.M., Stepanova A.N., Solano R., Wisman E., Ferrari S., Ausubel F.M. y Ecker J.R. 2003. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2992–2997 p.
7. Altamura M.M., Zaghi D., Salvi G., De Lorenzo G. y Bellincampi D. 1998. Oligogalacturonides stimulate pericycle cell wall thickening and cell divisions leading to stoma formation in tobacco leaf explants. *Planta.* 204: 429–436.
8. Alvarenga S. 2007. Laboratorio. Cultivo de Tejidos I. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. ITCR.
9. Álvarez I., Reynaldo I. y Brito M. 2012. Efecto del Pectimorf en la morfología y distribución de los estomas en plantas de frijol. En: VII Taller de Productos

- Bioactivos, Congreso Científico del INCA (18: 2012, nov 6- 9, Mayabeque). Memorias. CD- ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
10. Álvarez I., Reynaldo I., Cartaya O. y Terán Z. 2011. Efectos de una mezcla de oligogalacturónidos en la morfología de hortalizas de importancia económica. *Cultivos Tropicales*, vol. 32, no. 3, p. 69-74. ISSN 0258-5936.
 11. Alvis A., Vélez C.A., Villada H.S. y Rada-Mendoza M. 2008. Análisis físico-químico y morfológico de almidones de Ñame, Yuca y Papa y determinación de la viscosidad de las pastas. *Información Tecnológica*. Vol. 19(1), 19-28.
 12. Argueso C.T., Raines T. y Kieber J.J. 2010. Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current in Plant Biology* 13(5): 533- 539.
 13. Asante I. K. y Offei S.K. 2003. RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes *Euphytica* 131, 113–119 pp.
 14. Asghar S., Ahmad T., Ahmad I. y Yaseen M. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. 'Emma white'. *African Journal of Biotechnology*. 10 (16) : 3097-3103.
 15. Aziz A., Heyraud A. y LLambert B. 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Brottytis cinerea*. *Planta* 218: 767- 774.
 16. Azofeita A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17 (2): 221-242.
 17. Babak V., Ahmad E. y Masoud T. 2013. *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L.) Cv. 'Males Yazdi'. *Albanian j. Agric. Sci.* 12 (1): 1-5 p.
 18. Bajguz A. y Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1-8.
 19. Bao L. 2009. Efecto del Pectimorf y diferentes brasinosteroides en la embriogénesis somática de *Citrus macrophylla* Wester. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 57 p.
 20. Barbez E., Kleine- Vehn. 2013. Divide Et Impera-cellular auxin compartmentalization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 78-84.
 21. Barceló J., Nicolás G., Sabater B. y Sánchez R. 1995. Fisiología Vegetal. Eds pirámides, SA., Madrid, 650 p.

22. Bari R. y Jones J.D. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69. 473–488 pp.
23. Bellicampi D., Brown T.H., Shen O. M. y Parker A. 1995. Extracellular accumulation of an auxin- regulated protein in *Phaseolus vulgaris* L. cells is inhibited by oligogalacturonides. *J. Plant. Physiology* 147. 367-370 pp.
24. Bellicampi D., Salvi G., De Lorenzo G., Cervone F., Marfà V., Eberhard S., Darvill A. y Albersheim P., 1993. Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *The Plant Journal* 4: 207-213.
25. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F. y De Lorenzo G. 2000. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*, 2000, Vol.122, 1379–1385 p.
26. Bellincampi D., Salvi G., De Lorenzo G., Cervone F., Marfa` V., Eberhard S., Darvill A. y Albersheim P. 1993. Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *Plant J* 4: 207–213 p.
27. Beltrán J., Prías M., Al-Babili S., Ladino J., López D., Beyer P., Chavarriaga P. y Tohme J. 2010. Expression pattern conferred by a glutamic acid-rich protein gene promoter in Weld-grown transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Planta* 231: 1413–1424.
28. Beovides Y. 2001. Detección de variabilidad genética en clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) obtenidos por diferentes métodos de propagación. [Tesis de Maestría]. Universidad de La Habana.
29. Beovides Y., Milián M.D., Coto O., Rayas A., Basail M., Santos A., López J., Medero V.R., Cruz J.A., Ruiz E. y Rodríguez D. 2014. Caracterización morfológica y agronómica de cultivares cubanos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Cultivos Tropicales*, 2014, vol. 35, no. 2, p. 43-50.
30. Borcioni E. y Bonato R.R. 2012. Aplicação de análogo de brassinosteroide (Biobras 16[®]) sobre a germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de bocaiuva. *Ciencia Rural*, vol. 42, no. 2, p. 270-275.

31. Bosco M., Miertus S., Turchini S., Prosperi T., Ascone I. y Rizzo R. 2001. Structural studies on polygalacturonate gels: an EXAFS investigation combined with molecular modelling. *Carbohydr. Polym.* 119 (1): 134- 145 p.
32. Branca C., De Lorenzo G. y Cervone F. 1998. Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Physiol Plant* 72: 499–504
33. Brutus A., Sicilia F., Macone A., Cervone F. y De Lorenzo G. 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc Natl Acad Sci. USA* 107: 9452–9457 p.
34. Buchanan B. B., Gruissen W. y Jones R. L. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants, Maryland, EUA, American Society of Plant Physiologist.
35. Buitrago A. 1990. La yuca en la alimentación animal. En: Yuca: investigación, producción y utilización. Programa de Yuca, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia, Cali, p. 450.
36. Bull S.E., Owiti J.A., Niklaus M., Beeching J., Gruissem W. y Vanderschuren H. 2009. Agrobacterium-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. *Nat Protoc.* 4 (12): 1845-54.
37. Cabezas D., Moya M.B., Calderín A., Portuondo L., Pérez S., Marrero D., Mendosa L.J. y Salazar L.E. 2012. Efecto en los indicadores del crecimiento del cultivo *in vitro* de plátano cv. 'Enano Guantanamero' con el uso del Fitomas-E y ácidos húmicos. Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal (10: 2012 abril 17- 19, Santa Clara). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, Cuba.
38. Cabrera J.C. 2000. Obtención de una mezcla de (1-4)-D oligogalacturónidos bioactivos a partir de un grupo de subproductos de la industria citrícola. Tesis de Dr. en Ciencias Químicas. CNIC. La Habana.
39. Cabrera J.C. y Gutiérrez A. 1995. Preparation of pectic hydrolyses from cuban comercial pectin. *Cultivos Tropicales* (16) 2:30-34p.
40. Cabrera J.C. 2002. Desarrollo de activadores de las plantas de amplio espectro de acción. Informe Final de Proyecto. INCA. 2002. p 22.
41. Cabrera J.C., Gómez, R., Diosdado, E., Iglesias, R., Gutiérrez, A., González, S. y Hormaza J. 2003. Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos

- pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal. Patente Cuba certificado 22859, RES 155/2003. Calificación internacional de patentes AO1N9/12, CO 7H/033.
42. Cadavid L.F. 2005. Producción de Yuca. CIAT, Cali, Colombia, p 43.
 43. Castilla Y., González M. E. y Lara R. M. 2014. Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.), micropropagadas con Biobras-16. *Cultivos Tropicales*, vol. 35, no. 1, p. 67-74.
 44. Castilla Y., González M.E. y Xiques X. 2009. Establecimiento de una metodología para el conteo de cromosomas en el clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). *Cultivos Tropicales* v.30, n.1. versión ISSN 0258-5936, p. 31- 36.
 45. Castillo J.G., Estévez A., Salomón J.L., Vargas D., Hernández M.M., Pérez P., Borrás-Hidalgo O., López Y. y Arencibia A.D. 2010. Determinación de la estabilidad genética en cuatro especies del banco de germoplasma de papa en Cuba conservadas *in vitro*. *Cultivos Tropicales*, vol. 31, no. 3, p. 51-57.
 46. Ceballos H. y Cruz G. 2002. Taxonomía y morfología de la yuca. Capítulo 2. En: Ospina, B.; H. Ceballos (Eds). La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. p. 16- 32.
 47. Ceballos H. 2002. La yuca en el tercer milenio: Capitulo 1: En: Ospina, B.; H. Ceballos (Eds). La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. p. 1- 13.
 48. Ceballos H., Iglesias A.C., Pérez J.C., y Dixon, A. 2004. Cassava breeding: opportunities and challenges. *Plant. Mol. Biol.*, 56, p. 506-516. En: <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-004-5010-5>
 49. Ceballos H., Lentini Z., Pérez J.C. y Fregene M. 2004. Introduction of inbreeding in cassava through the productions of doubled haploids. En: International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network (6: 2004, 8- 14 March: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Abstracts: Cali, Colombia. p. 125.
 50. Cereda M.P. 2000. Characterization of edible films of cassava starch by electron microscopy, Braz. J. *Food Technol.*, ISSN: 1981-6723. En línea: <http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/bjft/20-00/p0040.pdf>. Acceso: 10 de junio 2008.

51. Cervone F. 2012. The role of the plant cell wall in signalling and against phytopathogenic microorganisms. En: Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal (10: 2012, abril 17- 19, Villa Clara). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
52. Cervone F. 2015. Plant innate immunity: signalling and recognition of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). In: Annual Report 2014. Scientific Report p. 71. Research Area 4: Molecular interactions. Istituto Pasteur Fondazione Cenci Bolognetti. Edited by Lucia Ugo with the collaboration of Caterina Cenci.
53. Cevallos M., Montes S., López M. y Cabrera L.C. 1998. Respuesta de un oligopeptato durante la germinación y conversión de los embriones somáticos de *Coffea canephora* var. Robusta. En Seminario Científico. (11: 1998: La Habana), INCA. 125 p.
54. Chacón M.R. y Cáceres H.E. 2012. Propagación *in vitro* de orquídeas de SANTANDER como estrategia para su conservación. En: Simposio Internacional de Biología Vegetal (10: 2012, abril 17- 19, Villa Clara). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
55. Chea A., Valera E. e Isidró M. 2004. Influencia de diferentes sustratos y bioproductos en la fase de aclimatación de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr). En: III Taller de Productos Bioactivos, Congreso Científico del INCA (14: 2004, nov 9- 12, La Habana). Memorias. CD- ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISBN 959-7023-27-X
56. Chhipi Shrestha J.K., Bhattarai T., Sijapati J., Rana N., Maharjan J., Rawal D.S., Raskoti B.B. y Shrestha S. 2013. Assessment of genetic diversity in nepalese populations of *Swertia chirayita* (Roxb. Ex Fleming) H. Karst using RAPD-PCR technique. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 1617-1628 pp. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.48196>. Published Online August 2013 (<http://www.scirp.org/journal/ajps>).
57. Chotikadachanarong K. y Deheeranupattana S. 2013. Micropropagation and acclimatization of *Stevia rebaudiana* B. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 16 (17): 887- 890 p.

58. Cid M., González- Olmedo J.C., Lezcano Y. y Nieves N. 2006. Influencia del Pectimorf sobre la calidad de la semilla artificial de la Caña de azúcar (*Saccharum* sp). *Cultivos Tropicales*, 2006, vol. 27, no 1, p. 31- 34.
59. Clay N.K., Adio A.M., Denoux C., Jander G. y Ausubel F.M. 2009. Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. DOI: 10.1126/science.1164627. *Science* 323, p. 95.
60. Clouse S.D. 2002. Arabidopsis mutant reveal multiple role for steroids in plant development. *Plant Cell* 14: 1995-2000.
61. COCINAYVINO. 2014. Los diversos usos de la yuca. [Consultado: 22/mayo/2014]. Disponible en: <http://cocinayvino.net/tips/tips-de-cocina/1913-los-diversos-usos-de-la-yuca.html>
62. Compant E., Climent C. y Sessitsch A. 2010. Plant growth promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 42, no. 5, p. 669-678.
63. Cosgrove D.J. 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review Cell Division. Biology* 13: 171-201.
64. Costales D., Martínez L. y Núñez M. 2007. Efecto del tratamiento de semillas con una mezcla de oligogalacturónidos sobre el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cultivos Tropicales* 28 (1): 85-91.
65. Cote F. y Hahn M.G. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology*, Vol. 26, p 1379–1411.
66. Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R. y Abrams S.R. 2010. Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 651–679.
67. Davies P.J. 2004. Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action! *Klumer Academic Publishers*. Dordrecht, The Netherlands.
68. Dawit B. 2009. Micropropagation of Selected Cassava Varieties (*Manihot esculenta* Crantz) from Meristem Culture. M.Sc Thesis submitted to the Department of Biological, Faculty of Science, Addis-Ababa University. 36 p.

69. De Lorenzo G., Brutus A., Savatin D.V., Sicilia F. y Cervone F. 2011 Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS Lett* 585:1521–1528.
70. Dellaporta L., Woody J. y Hich J. 1983. A plant molecular DNA minipreparation. Versión II. *Plant Molecular Biology* 1: 19-21.
71. Demeke Y., Tefera W., Dechassa N. y Abebie B. 2014. Effects of plant growth regulators on *in vitro* cultured nodal explants of cassava (*Manihot esculenta*) clones. *African Journal of Biotechnology*, Vol 13 (28), pp. 2830- 2839. DOI: 10.5897/AJB2013.13287.
72. Demey J.R., Zambrano A.Y., Fuenmayor F. y Segovia V. 2003. Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. *Interciencia*. Vol 28, No 12.
73. Denoux C., Galletti R., Mammarella N., Gopalan S., Werck D., De Lorenzo G., Ferrari S., Ausubel F.M. y Dewdney J. 2008. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol Plant* 1: 423–445.
74. Díaz B., Héctor E., Torres A., Cabañas M., Garcés N., Izquierdo H., Nuñez M. e Iglesias R. 2004. Empleo de productos bioactivos cubanos como sustitutos de los reguladores del crecimiento en la propagación del plátano macho (AAB). Fase de establecimiento *in vitro*. *Revista Alimentaria* 51 (359): 103- 107.
75. Diosdado E. 1997. Efecto de biorreguladores en el proceso de embriogénesis somática y cultivo y fusión de protoplastos en el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). Tesis de opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de La Habana, Facultad de Biología. 120 p.
76. Diosdado E., Doego Ch. M., Coll F., Jomarron Y., Robaina C. e Iglesias R. 1998. Efecto de biorreguladores cubanos en la obtención y mantenimiento de líneas celulares embriogénicas en cítricos. En III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal., REDBIO 98. La Habana (1-5 junio) 516p.
77. Domínguez L.A. 2011. Propagación *in vitro* de secciones de guayabo (*Psidium guajava* L.) y su respuesta a hormonas y periodos de subcultivos. Tesis de

- Maestría. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texococo, México. p. 24.
78. Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsu-Mendivil S., Ivanchenko M.G., Friml J. y Shishkova S. 2008. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8790–8794.
79. Dueñas F. 2005. Determinación de la variabilidad genética en clones y somaclones de bananos y plátanos del género *Musa*. [Tesis de Maestría]. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 74 p.
80. Dueñas F., Román M.I., González C., Xiqués X. y Valdés M. 2004. Empleo de marcadores en la detección de la variabilidad genética en somaclones de *Musa* spp. En: Programa y resúmenes del Congreso Científico del INCA (14: 2004 noviembre 9-12, San José de las Lajas).
81. Elektra S., Bari H. y Petrit R. 2013. The influence of season collection of explants on micropropagation of peach rootstock GF-677. *Albanian j. agric. sci.* 2013; 12 (1): 15-18 p.
82. El-Sharkawy M. A. 2006. Utility of basic research in plant/crop physiology in relation to crop improvement: a review and a personal account. *Bras. J. Plant Physiol*, vol. 18, no. 4, p. 419-446.
83. ELTIEMPO, 2014. Corresponsal Fabio Arenas. [visita: abril 2014]. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-3254363>.
84. Enríquez E.A., Aispuro E., Vargas I. y Martínez M.A. 2010. Oligosacarinas derivadas de la pared celular: actividad biológica y participación en la respuesta de defensa en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol 28, No 2, p 144-145.
85. Escobar R.H., Manrique N.C., Ríos A., Mafla G., Debouck D. y Tohme J. 2004. Implementation of the encapsulation-dehydration cryopreservation method for the cassava core collection. Sixth International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Abstracts. 8-14 March 2004, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 129.

86. Estrella H.J. 2012. Aspectos moleculares de la rizogénesis en plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) cultivadas *in vitro*. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México, 157 pp.
87. Falcón A.B. y Cabrera J.C. 2007. Actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturonidos en peciolo de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* L.). *Cultivos Tropicales*, 28 (2), 87- 90 p.
88. FAO. 2014. [Consultado: 8/abril/2015]. Disponible en: <http://www.fao.org>.
89. Feitosa T., Pinheiro J., Aguiar L., Jucá T. y Paiva F. 2007. Somatic Embryogenesis in Cassava Genotypes from the Northeast of Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50 (2): 201-206.
90. Fernando A., Barney V.E., Thome J. y Roca, W. 1996. Stability of cassava plants at the DNA level after retrieval from 10 years of *in vitro* storage. *Euphytica*, Vol 90, Issue 3, 307-313 pp.
91. Ferrari S., Galletti R., Denoux C., De Lorenzo G., Ausubel F.M. y Dewdney J. 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology* 144: 367-379.
92. Ferrari S., Savatin DV., Sicilia F., Gramegna G., Cervone F. y De Lorenzo G. 2013. Oligogalacturonides: plant damage- associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, Plant Physiology March 2013, Vol. 4, Article 49. DOI: 10.3389/fpls. 2013. 00049.
93. Florido M., Álvarez M., Lara R. M., Plana D., Varela M., Shagardsky T. y Moya C. 2002. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicum* spp). *Cultivos Tropicales*, vol. 23, no. 4, p. 61-69.
94. Fregene M., Tohme J., Roca W., Chavarriaga P., Escobar R. y Ceballos H. 2002. Biotecnología para la yuca. Capítulo 21. En: Ospina B.H. Ceballos (Eds). La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. p. 377- 405.
95. Friml J., Wisniewska J., Benkova E., Mendgen K. y Palme K. 2002. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415:806–809.

96. Galletti R., De Lorenzo G. y Ferrari S. 2009. Host-derived signals activate plant innate immunity. *Plant Signal Behav* 4: 33–34p.
97. Galletti R., Denoux C., Gambetta S., Dewdney J., Ausubel F.M., De Lorenzo G. y Ferrari S. 2008. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* 148: 1695–1706p.
98. Galletti R., Ferrari S. y De Lorenzo G. 2011. Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 157: 804-814 p.
99. Gantait S., Mandal N. y Das P.K. 2009. Impact of auxins and activated charcoal on *in vitro* rooting of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. cv. Golden Boy, *Journal of Tropical Agriculture*, vol. 47, pp. 84–86.
100. García D., Marrero M.T., Cuba M. y Nuñez M. 1997. Efecto cualitativo de análogos de brasinoesteroides como sustitutos hormonales en la callogénesis de café (*Coffea canephora* variedad 'Robusta'). *Cultivos Tropicales* 18 (2): 44- 46.
101. García M.G., Vega V.M. y Morales S.R. 1993. Effect of meristem culture micropropagation on the vigor and yield of the cassava clone 'Señorita'. In W. M. Roca, & A. M. Thro (Eds.), *Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*, Cartagena, Colombia, 25-28 August 1992. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Retrieved from <http://www.jonesbahamas.com>
102. Geada D. 2003. Variabilidad isoenzimática del género *Eucalyptus* en la región occidental de Cuba. [Tesis de Maestría]. Universidad de La Habana, 124 p.
103. GENEVESTIGATOR. 2014. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. En: online <https://www.genevestigator.ethz.ch>. Visitado enero 2014.
104. Goda H., Sawa S., Asami T., Fujioka S., Shimada Y. y Yoshida S. 2004. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 1555–1573 p.
105. Godoy L., Héctor E., Valera E. y Torres A. 2006. Callogénesis y regeneración *in vitro* de arroz (*Oryza sativa* L.) con los bioestimulantes cubanos BIOSTAN y LIPLANT. *Cultivos Tropicales*, vol. 27, no. 3, p. 31-36.

106. Gomes R, Duarte de Oliveira P. y Paiva R. 2013. Micropropagação de *Syngonanthus elegantulus*. *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 37, n. 1, p. 32-39, jan./fev.
107. González C. 1989. Comportamiento genético bioquímico de la lima persa SRA-58 (*Citrus latifolia* L.) sobre diferentes patrones en Cuba. [Tesis de Doctorado]. Universidad de La Habana, Cuba. 200 p.
108. González C. 2002. Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: Cornide, M. T. Marcadores Moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de plantas. La Habana: (Ed) Félix Varela. p. 36-66.
109. González C., Beovides Y., Román M.I., Xiques X., Florido M., Lara R.M. y Acosta R. 2004. Detección de la variabilidad genética en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* C.) mediante estudios isoenzimáticos y de proteínas totales. *Biología* 16 (1). p 42-28.
110. González J.U., Valerio R., Vargas T.E. y García E. 2006. Aspectos morfoanatómicos de callos originados durante el proceso de embriogénesis somática en banano 'Williams' subgrupo *Cavendish* (*Musa* sp. grupo AAA). *Agronomía Tropical*, 2006, vol. 56, no. 4, p. 697-703.
111. González M.E., Hernández M.M. y Hernández A. 2007. Comportamiento de diferentes genotipos de cafeto frente al empleo de un biopreparado bacteriano en la callogénesis. *Cultivos Tropicales*, vol. 28, no. 3, p. 39-45.
112. González O., Falcón A., Hernández M.M., Iglesias R., Silva J.J., López M., Rodríguez J.E., Arias L., Cabrera J.C. y Oliva E. 2004. Evaluación del efecto del Pectimorf en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de boniato clon CEMSA 78-354. *Biotecnología vegetal* Vol. 4, No. 2: 115 - 119, abril – junio.
113. González M.P., Fernández A., Fraga Y., Pino B., Hernández M.M. y Silva J.J. 2007. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD en plantas de *Ipomea batatas*. *Cultivos Tropicales* 28, 2, 39-43 pp.
114. Gonzalez L., Perrotta L., Acosta A., Orellana E., Spadafora N., Bruno L., Bitonti B.M., Albani D., Cabrera J.C., Francis D., Rogers H.J. 2014. In tobacco BY-2 cells xyloglucan oligosaccharides alter the expression of genes involved in

- cell wall metabolism, signalling, stress responses, cell division and transcriptional control. *Mol Biol Rep* 41: 6803–6816.
115. Grunewald W., Vanholme B., Pauwels L., Plovie E., Inze D., Gheysen G. y Goossens A. 2009. Expression of the *Arabidopsis* jasmonate signaling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO reports* Vol 10. No 8, 923-928 p.
 116. Hahn M.G., Darvill A.G. y Albersheim P., 1981. Hostpathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology* 68: 1161-1169.
 117. Harper R.M., Stowe-Evans E.L., Luesse D.R., Muto H., Tatematsu K., Watahiki M.K., Yamamoto K. y Liscum E. 2000. The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell* 12, 757–770 p.
 118. Hassan M.N., Afgani S. y Afees F. 2010. Suppression of red rot caused by *Colletotrichum* on sugarcane plant using plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol*, vol. 55, no. 4, p. 531-542.
 119. He J., Duan Y., Hua D., Fan G., Wang L., Liu Y., Chen Z., Han L., Qu L. y Gong Z. 2012. DEXH Box RNA Helicase–mediated mitochondrial reactive oxygen species production in *Arabidopsis* mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling. *The Plant Cell*, Vol. 24: 1815–1833, May. 1815- 1832 p.
 120. Héctor E., Torres A., Algoe S. y Cabañas M. 2005. Sustitución del ácido indolacético (AIA) por los bioestimulantes BB-6 y Biostan en el establecimiento y multiplicación *in vitro* del plátano macho (*Musa* sp. AAB) clon ‘Sobrino’. En: Memorias de la Conferencia Internacional sobre Desarrollo Agropecuario y Sostenibilidad AGROCENTRO. CD-ROM (3:2005).
 121. Héctor E., Torres A., Algoe S., Cabañas M. y López A. 2007. Propagación *in vitro* del plátano macho (*Musa* sp AAB) clon ‘Sobrino’ con los bioestimulantes cubanos BB-6 y Biostan como sustitutos de los reguladores del crecimiento. *Cultivos Tropicales* 28 (1): 13- 18 p.
 122. Hématy K., Cherk C. y Somerville S. 2009. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 408–413p.

123. Hernández A., Ascanio M.O., Morales M. y Cabrera A. 2005. Correlación de la nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba con las clasificaciones internacionales y nacionales: una herramienta útil para la investigación, docencia y producción agropecuaria. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana, Cuba: 18- 59 p.
124. Hernández A., Medina N., Quiñónez M., Hofte M., Hendrich M. y Hernández A.N. 2004. Strain identification of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* associated to maize crop by polyphasic taxonomi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 22, no. 2.
125. Hernández A., Plana R., Martín G. y Santander J.L. 2002. Estudio de algunos géneros microbianos asociados a diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) en suelo Ferralítico Rojo. *Cultivos Tropicales*, vol. 23, no 2, p. 10-15.
126. Hernández G.M., Sepulveda B., Richards A. y Soriano E. 2006. The architecture of *Phaseolus vulgaris* root is altered when a defense response is elicited by an oligogalacturonide. *Braz J Plant Physiol*, 18:351–355.
127. Hernández M.M. 2004. Rescate y Producción de clones locales de yuca y malanga a través de métodos biotecnológicos. En: Informe de Etapa Proyecto Internacional Rescate y Producción de clones locales de yuca y malanga a través de métodos biotecnológicos». Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA-CIAT). La Habana. Cuba.
128. Hernández M.M., Suárez L. y Valcárcel M. 2009. Empleo del Pectimorf en la micropropagación de *Spathiphyllum* sp. *Cultivos Tropicales* 30 (3), 56- 58 p.
129. Hernández M.M., Suárez L., Castilla Y., González M.E., Valcárcel M y López M. 2006. Empleo de una mezcla de oligogalacturónidos en la micropropagación de la malanga (*Colocasia* sp.), var. 'Camerum 14'. En: Congreso Científico del INCA (15: 2006, nov 7-10, La Habana). Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISBN 959-7023-36-9.
130. Hernández R.M., Lara R.M., Diosdado E., Cabrera J.C., González C., Valdés M. y Xiqués X. 2007. Evaluación de la efectividad del Pectimorf en la embriogénesis somática de mandarina 'Cleopatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan). *Cultivos Tropicales*, vol. 28, no. 4, p. 25-31.

131. Hernández R.M., Diosdado E., Cabrera J.C. y Coll F. 2010. Efecto de los biorreguladores del crecimiento en la embriogénesis somática de Mandarina 'Cleopatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) *Cultivos Tropicales*, 2010, vol. 31, no. 3, p. 32-38
132. Hernández Y., González M.E. y Kessel A. 2010. Embriogénesis somática de explantes foliares de *Pouteria campechiana* establecidos *in vitro*. En: Congreso Científico del INCA (17: 2010, nov 22-26, La Habana). VII Taller de Biotecnología Vegetal. Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
133. Hernández-Mata G., Mellado M.E., Richards A., López J., Beltrán E. y Soriano E.L. 2010. Plant immunity induced by Oligogalacturonides alters root growth in a process involving flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul.*, 29: 441–454.
134. Hershey C. y Amaya A. 1983. Genética, citogenética, estructura floral y técnicas de hibridación de la yuca. En: Yuca: investigación, producción y utilización. Programa de Yuca, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1983. Colombia, Cali, p. 113- 126.
135. Hetherington A.M. y Woodward F.I. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 21: 901-908.
136. Hine A., Rojas A., Daquinta M. 2014. Establecimiento *in vitro* de dos especies nativas de Costa Rica: *Terminalia amazonia* (Amarillón) y *Vochysia allenii* (Botarrama Blanco). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XVI No. 2 Diciembre 2014. 180-186. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47240>.
137. Hoover R. 2002. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches, *Carboh. Polym.* 49(4), 425-437.
138. Iglesias L. 1986. Estudio de la variabilidad morfoagronómica- bioquímica en soya (*Glycine max* Merrill). Tesis de Grado (Candidato a Doctor en Ciencias Agrícolas). 128p.
139. INFOJARDIN. 2011. Manejo de la fertilización foliar y bioestimulantes. [En línea]. [Consultado: 30 de marzo de 2011]. Disponible en: <www.infojardin.com/foros/showthread.php>.

140. INIVIT. 2004. Cultivo de la yuca. Instructivo Técnico. [Consultado: 15/5/2006]. Disponible en: <http://www.cubaciencia.cu/instructivos/cultivodelayuca.htm>.
141. Izquierdo H. 2009. Los oligogalacturónidos de origen péctico y su acción en las plantas. *Temas de Ciencia y Tecnología de México*, vol. 13, no. 39, p. 31-40.
142. Izquierdo H. 2013. Empleo de nuevas sustancias como reguladores del crecimiento en la micropropagación del banano (*Musa spp*) clon 'FHIA-18' (AAAB). Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Mayabeque. p. 100.
143. Izquierdo H., González M.C., Núñez M., Proenza R. y Cabrera J.C. 2009. Influencia de un oligogalacturónido en la aclimatización de vitroplantas de banano (*Musa spp.*) del clon 'FHIA-18' (AAAB) *Cultivos Tropicales*, vol. 30, no. 1, p. 37-42
144. Jiménez E.A. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez, JN. (1ra Ed). Propagación y Mejora Genética de las Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Martha Abreu" de las Villas, Santa Clara, Cuba, 13-24 p.
145. Kessel A., Lara R.M., Hernández M.M., Coto O., Díaz Y., Caballero A. y Pavón M.I. 2014. Evaluación morfoagronómica e isoenzimática de cultivares de *Fragaria ananassa* Duch., cultivados en Cuba. *Cultivos Tropicales*, vol. 35, no. 2, p. 72-79.
146. Kieffer M., Neve J. y Kepinski S. 2010. Defining auxin response contexts in plant development. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 12–20p.
147. Kim T.H., Böhmer M., Hu H., Nishimura N. y Schroeder J.I. 2010. Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 561–591p.
148. Knudson L. 1946. A new nutrient medium for germination of orchid seeds. *Am. Orchid Soc. Bull.* 15: 214-217.
149. Kuderova A., Urbánková I. y Válková M. 2008. Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiol.* 49:570–582.
150. Kyaligonza V., Kawuki R., Ferguson M., Kaweesi T., Baguma Y. y Vuzi P. 2014. Identification of F1 Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) progeny using microsatellite markers and capillary electrophoresis. *American Journal of Plant*

- Sciences*. 5, 119-125 pp. Published Online January 2014 (<http://www.scirp.org/journal/ajps>) <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.51015>.
151. Laemmli U.K. 1970. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, 227, 680- 685.
152. Lalitha N., Kiho S., Banerjee R., Chattopadhyay S., Saha A.K. y Bindroo B.B. 2013. High frequency multiple shoot induction and *in vitro* regeneration of mulberry (*Morus indica* L. cv. S-1635). *International Journal of Advanced Research*, Volume 1, Issue 1, 22-26 p.
153. Laplaze L., Benkova E. y Casimiro I. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* 19:3889–3900.
154. Lara R.M., Florido M., Plana D., Moré O., González M.E., Álvarez M. y Hernández. R.M. 2003. Isoenzymatic analysis for detecting *in vitro* variability and/or stability of economically important crops. *Cultivos Tropicales*, vol. 24, no. 3, p. 39-47.
155. Lau S., Slane D., Herud O., Kong J., Juergens G. 2012. Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. En: Merchant SS (Ed) *Annual Review of Plant Biology* 63: 483-502.
156. Li H., Guo J., Huang Y., Liang C. y Liu H. 1998. Potrykus y J. Puonti- Kaerlas. *Plant Cell Reports* 17: 410- 414.
157. Li H.Q., Huang Y.W., Liang C.Y. Guo J.Y. 1995. Improvement of plant regeneration from secondary embryos of cassava. In: *The Cassava Biotechnology Network: Proceeding of the Second International Scientific MMeeting*, Bogor, Indonesia, 22-26 August 1994. Cali, Colombia: CIAT. 2v.-(Working document No. 150).p. 289-302.
158. Li J., Dai X. y Zhao Y. 2006. A Role for Auxin Response Factor 19 in Auxin and Ethylene Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, March, Vol. 140, 899–908p.
159. Liang Y., Wang X., Hong S., Li Y. y Zuo J. 2012. Deletion of the initial 45 residues of ARR18 induces cytokinin response in Arabidopsis. *Journal of Genetics and Genomics* 39 (1): 37- 46.

160. López C., Jorge V., Piégu B., Mba C., Cortes D. y Restrepo S. 2004. A unigene catalogue of 5700 expressed genes in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Mol Biol.* 54:541-554.
161. López C. 1990. Medios de cultivo. En: Fundamentos Teórico Práctico del Cultivo de Tércidos Vegetales. Eds Cadmo, H. R y V. M. Villalobos. Roma: FAO. p. 15-19.
162. Malik S., Zia M., Riaz R. y Chaudhary M.F. 2007. *In vitro* plant regeneration from direct and indirect organogenesis of *Momordica charantia*. *Pak. J. Biol. Sci.* 41: 18-22.
163. Mantilla J.E. 1996. Producción de material de yuca. En: La yuca frente al hambre del mundo tropical. La yuca frente al hambre del mundo tropical. Maracay, Venezuela: A. Montaldo (Ed.). p. 35- 55.
164. Mapayi E.F., Ojo D.K., Oduwaye O.A. y Porbeni J.B. 2013. Optimization of *in vitro* propagation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genotypes. *Journal of Agricultural Science*, Vol. 5, No. 3, p 261- 269.
165. Marković M., Popović M. y Vilotić D. 2013. Micropropagation of *Dianthus deltoides* L. through Shoot Tip and Nodal Cuttings Culture. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 65 (1), 17-22 p.
166. Martínez P., Sánchez R., Vaknin Y., Dicenta F. y Gradziel T.M. 2005. Improved technique for counting chromosomes in almond. *Scientia Horticulturae*, vol. 105, p. 139-143.
167. Medero V. 2006. Embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). [Tesis de Doctorado]. Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, Cuba, p. 5.
168. Medero V.R., Borroto C., Rodríguez S., Gómez R., López J., García M., Ventura J., Espinosa J., Cabrera M., Martínez M., Torres M., Torres Y., Álvarez M. y García J. 2000. Embriogénesis somática a partir de meristemos axilares en yuca. *Bioteconología Vegetal*. 1. 21-26.
169. Medero V., Rayas A., Rodríguez S., López J., Cabrera M., Basail M., Rodríguez G., Martínez M., Torres M., Arce D., Bravo Y. y Pons C. 2010. Metodología para la regeneración de plantas por embriogénesis somática del clon

- de yuca 'INIVIT Y 93-4'. En: Congreso Científico del INCA (17: 2010, nov 22-26, La Habana). VII Taller de Biotecnología Vegetal. Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
170. Medero V., Rodríguez S., Borroto C., Gómez R., López J., de Feria M., García M., Ventura J., del Sol L., Cabrera M., Pons C., Cortés C., Martínez M., Álvarez M. y García J. 2001. Sistema de Inmersión Temporal para producción intensiva de material de siembra de yuca. Continente yuquero; Informativo del Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la investigación y Desarrollo de la Yuca, CLAYUCA. No 3, p. 10- 11.
171. Medina R.D., Faloci M.M., Solís N. y Mroginski L.A. 2003. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias del INTA*, vol. 32, no. 3, p. 143-160.
172. Milián M.D., Sánchez I., Rodríguez S., Ramírez T., Cabrera M., Medero V. y Guerra D. 2000. Caracterización, evaluación y conservación de la colección cubana de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). LJ Carvalho, AM Thro y AD Vilarinhos (eds). Proceeding IV International Scientific Meeting Cassava biotechnology Network. Brasilia. 626 p.
173. Monsoor M. 2005. Effect of drying methods on the functional properties of soy hull pectin. *Carbohydrate Polymers* 61 (3): 362-367 p.
174. Montano R., Zuaznabar R., García A., Viñals M. y Villar J. 2007. FitoMas-E. Bionutriente Derivado de la Industria Azucarera. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar, 41 (3): pp.14-21.
175. Mora M., Pérez A., Carvajal C., Hernández M. y Trujillo R. 2010. Cultivo *in vitro* de (*Hohenbergia penduliflora*) en biorreactores de inmersión temporal para la obtención de proteasas. En: Congreso Científico del INCA (17: 2010, nov 22-26, La Habana). VII Taller de Biotecnología Vegetal. Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
176. Moré O. 2000. Empleo de nuevos biorreguladores en la obtención de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum* L). [Tesis en opción al título de

Maestría en Biotecnología Vegetal]. Universidad de La Habana-Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba.

177. Moya M.B., Cabezas D., Calderín A., Marrero D., Mendoza L.J. y Salazar L.E. 2010. Efecto del Fitomas-E y Ácidos Húmicos sobre el cultivo *in vitro* del Plátano clon 'Enano Guantanamero'. En: Congreso Científico del INCA (17: 2010, nov 22-26, La Habana). Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
178. Moya M.B., Isidró M., Rodríguez D. y Valera V. 2006. Efecto del Pectimorf y el Biobras-16 en la micropropagación de la piña (*Ananas comosus*). En: Congreso Científico del INCA (15: 2006, nov 7-10, La Habana). Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISBN 959-7023-36-9.
179. Mronginski L.A. y Roca W. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p. 127.
180. Muller B. y Sheen J. 2008. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* 453:1094–1097.
181. Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, vol. 15, p. 473-497.
182. Nassar N.M.A., Junior O.P., Sousa M.V. y Ortiz R. 2009. Improving Carotenoids and Amino-Acids in Cassava. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agri.*, 1(1), 32-38 p.
183. Nguyent L.T., Gheewala S.H. y Garivait S. 2007. Full chain energy analysis of fuel ethanol from cassava in Thailand. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, p. 4135-4142. [Consultado 25-01-2009]. Disponible en: <<http://biopact.com/2007/09/ciat-cassava-ethanol-could-benefit.html>>.
184. Nieves N., Poblete A., Cid M., Lezcano Y., González-Olmedo J.L. y Cabrera J.C. 2006. Evaluación del Pectimorf como complemento del 2,4D en el proceso de embriogénesis somática de la caña de azúcar (*Saccharum spp*). *Cultivos Tropicales* 27 (1): 25-30p.
185. Nkere C.K., Umezurumba I.C. y Mbanaso E.N. 2009. *In vitro* Ginger: screening of starch from different cassava varieties as gelling agent in medium *Plant sciences Research* 2(2): 20- 22.

186. Noerhadi E. y Widiyanto S.N. 1982. Callus growth of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). En: Internacional Scientific Meeting (5: 1982, 5, 12: CIAT). Proceedings *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 85- 86 p.
187. Nordstrom A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Åstot C., Dolezal K. y Sandberg G. 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *PNAS* 2004;101;8039-8044; originally published online May 14, 2004; doi:10.1073/pnas.0402504101.
188. Núñez M., Mazorra L. M., Reyes Y. y Martínez L. 2010. Los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas a estrés abióticos. Una visión actualizada. *Cultivos Tropicales*, vol. 31, no. 2, p. 56-65.
189. Núñez M., Reyes Y., Rosabal L., Martínez L., González M.C. y Pieters A. 2013. Brasinoesteroides y sus análogos estimulan el crecimiento de plántulas de dos genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) en medio salino. *Cultivos Tropicales*, vol. 34, no. 1, p. 74-80.
190. Ochoa J.C., Chavarriaga P. y López C. 2012. Embriogénesis somática y producción de callo embriogénico friable de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV No. 2 Diciembre. 20-27 p.
191. Olasanmi B., Akoroda M.O., Okogbenin E., Egesi C., Kahya S.S., Onyegbule O., Ewa F., Guitierrez J., Ceballos H., Tohme J. y Fregene M. 2014. Bulk segregant analysis identifies molecular markers associated with early bulking in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica*, 195. 235–244 pp. DOI 10.1007/s10681-013-0991-2.
192. Oliveira M.N., Pereira S., Pereira F.J. y de Castro E.M. 2012. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância à diferentes condições ambientais. *Revista Ciencia Agronômica*. Vol.43, No.2, Apr./June 2012. [Online version ISSN 1806-6690].
193. Oliveira E. y Miglioranza E. 2014. Densidade e distribuição estomática em mandioca *Manihot esculenta* Crantz cultivar IAC 576-70. *Scientia Agropecuaria* 5, 135 -140p.

194. Onuoch C.I. y Onwubiku N.J.C. 2007. Micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using different concentration of Benzyaminiopurin (BAP). *J. Engineering and Applied Sci.*, 2(7), 1229-1231.
195. Perea M. 1993. Sistemas de propagación clonal y obtención de plantas libres de patógenos. En: X Curso Nacional: cultivo de tejidos vegetales y sus aplicaciones en la agricultura, INIVIT: mayo- junio. 1993. p. 33- 42.
196. Pérez A.T., Nápoles L., Concepción O. y Trujillo R. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L) var 'Enana Roja Cubana' EEA 18-24 obtenido a partir de semilla. *Cultivos Tropicales* 23 (3): 57- 61 p.
197. Pérez J.L., García L., Veitía N., Bermúdez I. y Collado R. 2013. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la respuesta embriogénica de soya cultivar INCASoy-27. *Cultivos Tropicales*, vol. 34, no. 3, p. 40-44.
198. Pérez J.A. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez, JN. (1ra Ed). Propagación y Mejora Genética de las Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Martha Abreu" de las Villas, Santa Clara, Cuba, 13-24 p.
199. Perez-Tornero O., Tallon C.I. y Porras I. 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue, and Organ Culture*, 100: 263–271.
200. Pernisova M., Klíma P., Horak J., Valkova M., Malbeck J., Soucek P., Reichman P., Hoyerova K., Dubova J., Friml J., Zazimalova E. y Hejatko J. 2008. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. En online at: www.pnas.org/cgi/content/full/0811539106/DCSupplemental.
201. Pierick R.L.M. 1991. Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. En: Debergh P.C. and Zimmerman R.H. (Ed). Micropropagation: technology and application. Kluger Academic Publisher. Printer in Netherlands.
202. Pierre- Jerome E., Moss B.L., Nemhauser J.L. 2013. Tuning the auxin transcriptional response. *J. Exp. Bot.* 64: 2557-2563.
203. Pinzón F.E. 2004. Influencia del oligopeptato Pectimorf y el análogo de brasinosteroides Biobras-6 en la propagación *in vitro* del clon de banano 'FHIA-

- 18' (*Musa sp.* AAAB). Trabajo de Diploma (en opción al título de Ingeniero Agrónomo). Universidad Agraria de La Habana. Cuba. 72 p.
204. Plana D., Álvarez M., Florido M., Lara M.R. y Cabrera J.C. 2003. Actividad biológica del Pectimorf en la morfogénesis *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum* M) var. 'Amalia'. *Cultivos Tropicales*, vol. 24, no 1.
205. Portieles R., Rodríguez R. y Cornide M.T. 2004. Cytogenetic characterization of new wild clones of the *Saccharum* complex. *Cultivos Tropicales* 25 (1): 17-22.
206. Portieles R., Rodríguez R., Hernández I., Canales E. y Cornide M.T. 2002. Determinación del número cromosómico de un grupo de clones silvestres de origen desconocido y clones de fundación del complejo *Saccharum*. *Cultivos Tropicales*, vol. 23, no. 2, p. 69-72.
207. Posada, L. 2016. Embriogénesis somática y enraizamiento *in vitro* fotoautotrófico en papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol Roja. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Santa Clara.
208. Raemakers C.J.J.M., Jacosen E. y Visser R.G.F. 1995. Histology of somatic embryogenesis and evaluation of somaclonal variation. In: The Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the Second International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia, 22-26 August. Cali, Colombia: CIAT. 2v.- (Working document No. 150). P. 336-354.
209. Rahman A., Hosokawa S., Oono Y., Amakawa T., Goto N. y Tsurumi S. 2002. Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiol.* 130, 1908–1917.
210. Ren X., Chen Z., Liu Y., Zhang H., Zhang M., Liu Q., Hong X., Zhu J.K. y Gong Z. 2010. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 63: 417–429.
211. Riefler M., Novak O., Strnad M. y Schmulling T. 2006 *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18:40–54.
212. Rimoldi F., Soares P., Filho V., Kvitschal M.V., Gonçalves-Vidigal M.C., Prioli A.J., Pinto Prioli S.M. y Ribeiro da Costa T. 2010. Genetic Divergence in Sweet

- Cassava Cultivars Using Morphological Agronomic Traits and RAPD Molecular Markers. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.53 n. 6. Nov/Dec. 1477-1486 pp. ISSN 1516-8913.
213. Roca W. y Beltrán J. 1984. El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Guía de estudio. Serie 04SC-05.03. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p 44.
214. Roca W.M., Nolt B., Mafla G., Roa R. y Reyes R. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones Colombia, Cali, CIAT: Eds. Roca W. M. y Mroginski L. A. p. 403- 420.
215. Rodríguez L., González M.C. y González R. 2010. Micropropagación de *Encyclia phoenicea*, orquídea epífita endémica de Cuba. En: Congreso Científico del INCA (17: 2010, nov 22-26, La Habana). VII Taller de Biotecnología Vegetal. Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
216. Rodríguez L., Rodríguez R. y Díaz A. 2010. Multiplicación de *Cedreia odorata* L. mediante la propagación a partir de explantes nodales y la embriogénesis somática. En: Congreso Científico del INCA (17: 2010, nov 22-26, La Habana). VII Taller de Biotecnología Vegetal. Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
217. Rodríguez A., Rodríguez-Nodal A., Román M.I., Fundora Z. y Castiñeira L. 2001. Morphological and isoenzyme variability of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) germoplasm in Cuba. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 126. 31-40 p.
218. Rodríguez G. 2015. Conferencia Inagural III Simposio Internacional de Raíces, Rizomas, Tubérculos, Plátanos, Bananos y Papaya, del 20 al 23 de octubre de 2015, en Santa Clara, Cuba.
219. Román M.I. y Rodríguez A. 1986. Estudios citogenéticos e implicaciones taxonómicas en ocho cultivares de plátano (*Musa* spp.). *Ciencia y Técnica de la Agricultura Viandas Tropicales* 7 (1): 7- 14.
220. Román M. I., González C., Xiqués X., Valdés M., Alonso M., Dueñas F., Ramírez T. y González L. 2004. Diversidad genética de los bananos (*Musa* spp.) en Cuba. Memorias de la Convención Trópico (2004 abril 4-9 La Habana).

221. Román M. I., Xiqués X., González C., Dueñas F., Alonso M., Hernández M., González L., Ramírez T., Valdés M. y Rojas A. 2006. Caracterización citogenética en materiales obtenidos por diferentes métodos de propagación en bananos y plátanos. En: Programa y resúmenes del Congreso Científico del INCA (15:2006 noviembre 7-10: San José de las Lajas).
222. Román M.I. 2004. Estudio de la diversidad genética en accesiones de bananos y plátanos (*Musa spp*) en Cuba. Tesis presentada en opción al Título de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. UH. 127 p.
223. Rudd S. 2003. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends in Plant Science*. 8:321-329.
224. Ruíz J., Terry E., Tejeda T. y Díaz M.M. 2009. Aplicación de bioproductos a la producción ecológica de tomate. *Cultivos Tropicales*, vol. 30, no 3, p. 6
225. Ruiz L.A., Simó J. y Rivera R. 2010. Nuevo método para la inoculación micorrízica del Cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Cultivos Tropicales*, vol. 31, no. 3, p. 15-20.
226. Sajeevan R.S., Jeba Singh S., Nataraja K.N. y Shivanna M.B. 2011. An efficient *in vitro* protocol for multiple shoot induction in mulberry, *Morus alba* L variety V1. *International Research Journal of Plant Science* 2(8): 254-261.
227. Sakurai T., Plata G., Rodríguez-zapata F., Seki M., Salcedo A., Toyoda A. y Ishiwata A. 2007. Sequencing analysis of 20,000 full-length cDNA clones from cassava reveals lineage specific expansions in gene families related to stress response. *BMC Plant Biol*: 7:66.
228. Salazar S. 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (*Orchidaceae*). *Acta Agronómica*. 61 (1): 68-78.
229. Salazar S. y Cancino G. 2012. Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14 (1): 53-59.
230. Salazar S., Amaya A. y Barrientos F. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15 (2): 97-105.

231. Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
232. Savatin D.V., Ferrari S., Sicilia F. y De Lorenzo G. 2011. Oligogalacturonide-auxin antagonism does not require posttranscriptional gene silencing or stabilization of auxin response repressors in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 157: 1163-1174.
233. Schools H.A., Vierhuis E., Bak E.J. y Voragen A.G. 1995. Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. *Carbohydr. Res.* 275: 343- 360 p.
234. Seeta S., Vidya B., Sujatha E. y Anuradha S. 2002. Brassinosteroids- A new class of phytohormones. *Current Science* 82 (10): 1239- 1245.
235. Shuju N., Yingjiao Z., Renlei Z., Lanfang Z., Jianyong L. y Daozhi W. 2012. RAPD analysis for genetic diversity of germplasm resources of *Strobilanthes*. *Agricultural Sciences.*, Vol.3, No.3, 400-404 pp. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2012.33047>
236. Simmonds N.E. 1976. Evolution of crop plants. 3a. ed. Londres, Reino Unido y Nueva York Ed. Longman. p. 339.
237. Soumen S., Abdul K., Chandan S. y Parthadeb G. 2012. *In Vitro* Propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and Its Evaluation of Genetic Fidelity Using RAPD Marker. *American Journal of Plant Sciences* 3, 64-74 pp. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.31006> Published Online January 2012 (<http://www.SciRP.org/journal/ajps>)
238. Souza Moreira F.M., Da Silva K., Abrahão Nobrega R.S. y De Carvalho F. 2010. Bactérias diazotróficas asociativas: diversidade, ecología e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 2010, no. 1, p. 79-99.
239. Stamp J.A. y Henshaw G.G. 1982. Somatic embryogenesis in cassava. *Zeitschrift fur Pflanzen physiologie*, vol. 105, p. 97-102 p.
240. Standen J.V., Zazimalova, E. y George E.F. 2008. Plant growth Regulators II: Cytokinin, their Analogues and Antagonists. In: George EE, Hall MA and de Klerk G. (Eds). 3: 205- 226.

241. Solis R.; Oivera J.; La Sosa R. 2011. Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales. *Rev. peru. biol.* 18(3): 343 – 347. ISSN 1727-9933 (on line).
242. Suárez L., Hernández M.M. y Telléz G. 2013. Empleo de la propagación *in vitro* como alternativa de conservación de *Encyclia grisebachiana* C. (*Orchidaceae*). En: Congreso Mesoamericano de Biología y Conservación (17: 2013, sept 16- 20, La Habana). Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba.
243. Suárez L., Hernández M.M., Valcárcel M., Lopez M. y Almaguer Y. 2006. Producción acelerada de plántulas *in vitro* de dos especies de orquídeas terrestres (*Spathoglottis plicata* B. y *Bletia purpurea* B.). En: Congreso Científico del INCA (15: 2006, nov 7-10, La Habana). Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISBN 959-7023-36-9.
244. Suárez L., Savatin D., Salvi G., De Lorenzo G., Cervone F. y Ferrari S. 2013. The non-traditional growth regulator Pectimorf is an elicitor of defense responses and protects *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* **95** (1), p.177-180.
245. Supajit S., Boonchanawiwat A., Thanyasiriwat T., Boonseng O., Tabata S., Sasamoto S., Shirasawa K., Isobe I., Lightfoot D., Tangphatsornruang S. y Triwitayakorn K. 2011. SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet.* 122, 1161–1170 pp. DOI 10.1007/s00122-010-1520-5
246. Sutan A.N., Popescu A. e Isac V. 2010. The influence of the season and culture medium on micropropagation of two intergeneric *Fragaria x Potentilla* varieties. *Analele Universita*, 17(1): 190-195.
247. Swarup R., Parry G., Graham N., Allen T. y Bennett M. 2002. Auxin cross-talk: Integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Mol. Biol.* 49, 411–426.
248. Taiz L. y Zeiger E. 2006. Plant physiology. (4 Eds) Sinauer Associates Inc. Publischer, Sunderland. pp. 223-672.

249. Terry E., Padrón J.R., Tejeda T., Reynaldo I. y Díaz M.M. 2011. Respuesta del cultivo de la Lechuga (*Lactuca sativa* L.) a la aplicación de diferentes productos bioactivos. *Cultivos Tropicales*, vol. 32, no. 1, p. 77-82.
250. Tirado A. y Cabañas M. 2012. Efecto de los bioestimulantes Liplant y Biostan en la propagación *in vitro* del Plátano macho (*Musa* sp. AAB). En: Congreso Científico del INCA (18: 2012, nov 6-9, Mayabeque). Memorias CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.
251. Toledo J., Espinosa N. y Golmirzaie A. 1998. Cultivo de téjidos. Manejo de plántulas *in vitro* en la producción de semilla de papa. Centro Internacional de la papa (CIP). Manual de Capacitación. Lima. Perú. 46p.
252. Ton J., Flors V. y Mauch-Mani B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14: 310–317 p.
253. Torriente D. 2010. Aplicación de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal en el cultivo de la Caña de Azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*, vol. 31, no. 1, p. 19-26.
254. Tran L.S.P., Urao T. y Quin F. 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20623–20628.
255. Tromas A. y Perrot- Rechenmann C. 2010. Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies*, 333 (4): 297- 306.
256. Tyagi R.K., Agrawal A., Mahalakshmi C. y Hussain Z. 2007. Low-cost media of *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RADP markers. *In Vitro Cell Developmental Biology- Plant* 43, 51- 58 pp.
257. Vacin E.F. y Went F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot Gaz* 110:605–613.
258. Valdés M., González C., Lara R.M., Román M.I., Hernández Y., Hernández R.M., Cabrera M. y Torrecilla G. 2010. Diversidad genética de especies silvestres del género *Nicotiana* L.: caracterización mediante marcadores bioquímicos. *Rev. Protección Veg.*, vol. 25, no. 2, p. 88-97.

259. Venkatachalam L., Sreedhar R.V. y Bhagyalakshmi N. 2007. Genetics analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. *In Vitro Cell. Developmental Biology-Plant* 43, 267-274 pp.
260. Villalobos V.M. y Thorpe T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca WM. y Mroginski LA. (Ed). Cultivo *in vitro* en la Agricultura. CIAT. 128- 141p.
261. Viñals M., García A., Montano R., Villar J., García T. y Ramil M. 2011. Estimulante de crecimiento agrícola FITOMAS ®; resultados de producción del año 2010 y su impacto en cultivos seleccionados de alimentos ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. 45, núm. 3, septiembre-diciembre, pp. 1-23.
262. Wang L., Hua D., He J., Duan Y., Chen Z., Hong X., y Gong Z. 2011. Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *Genet.* 7: e1002172.
263. Wilkinson H. 1979. The plant surface (mainly leaf). In Metcalfe CR y L Chalk eds. *Anatomy of Dicotyledons*. Oxford, London, UK. Clarendon Press. p. 97-165.
264. Xiqués X. 2002. Caracterización citogenética de la variabilidad en plantas. In: Cornide M.T., editor *Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genetic y selección de las plantas*. Capítulo 3. La Habana; p. 67- 91.
265. Xu X., Chen C., Fan B. y Chen Z. 2006. Physical and fungal interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18: 1310-1326 p.
266. Yam T. y Arditti J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*. 3 (1): 1-56.
267. Yin X., Wang J., Duan Z., Wen J. y Wang H. 2006. Study on the stomatal density and daily change rule of the wheat. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, Vol. 22, p 237–242.
268. Yong J., Ge L., Yan F. y Ngim S. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*. 14: 5144-5164.

269. Yoshioka H., Numata N., Nakajima K., Katou S., Kawakita K. y Rowland O. 2003. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and Nbrboh B participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15: 706- 718p.
270. Yoshioka H., Sugie K., Park H.J., Maeda H., Tsuda N., Kawakita K. y Doke N. 2001. Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol. Plant Microbe Interact* 14: 725-736 p.
271. Zacarias A.M., Botha A.M., Labuschagne M.T. y Benesi I.R.M. 2004. Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm from Mozambique using RAPD fingerprinting. *Euphytica* 138, 49–53 pp.
272. Zambrano A.Y., Demey J.R., Fuenmayor F., Segovia V. y Gutiérrez Z. 2003. Diversidad genética de una colección de *Manihot esculenta* Crantz a través de marcadores moleculares RAPDs. *Agronomía Tropical* 53. 157-174 p.
273. Zapata A., Neme R., Sanabria C. y López C. 2011. Análisis de ESTs de yuca (*Manihot esculenta*): una herramienta para el descubrimiento de genes. *Acta Biol.Colomb.* vol.16 no.1 Bogotá Jan./Apr.
274. Zuaznábar R., Jiménez G., Díaz J.C., Montano R., Villar J. y García A. 2008. Resultados de las aplicaciones de FitoMas-E en plantaciones comerciales de caña de azúcar en los últimos 4 años. Diversificación 2008. Octubre.
275. Zuraida A.R., Izzati K.F.L., Nazreena O.A., Radziah C.M.Z., Asyikin S.G.S. y Sreeramanan S. 2014. *In Vitro* Regeneration of *Curcuma caesia* Plantlets from Basal Part and via Somatic Embryogenesis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, pp. 363-372. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2014.54044>.



ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo1. Características químicas del sustrato empleado para los diferentes experimentos en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares 'CMC-40' y 'Señorita'.

pH H₂O	MO (%)	P₂O₅ (mg.100g⁻¹)	Ca	Mg	Na	K
(cmol kg⁻¹)						
7,5	20,7	460	23,5	15,0	0,15	0,22

Anexo 2. Composición del medio para el crecimiento y enraizamiento *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) propuesto por INIVIT (2004).

Componentes	Cantidad utilizada para 1L
Macros	8,33 ml
EDTA	3,33 ml
Sacarosa	20,0 g
CaCl ₂	0,96 ml
Micros	0,33 ml
KI	0,33 ml
Tiamina	0,13 mg
Mioinositol	0,033 mg
ANA (Ácido nalftalenacetico)	0,01 mg
Agar	6,5 g
pH	5,7