Desarrollo de estrategias para la propagación de especies de plantas proteicas y forrajeras

Rafael Gómez-Kosky[1], Irenaldo Delgado-Mora[1], María del Carmen Hernández-León[1], Edel Alejandro Toledo-Rodriguez[1], Jercy Álvarez-Fernández[1], Mirelis Alejo-Sierra[1], Ada Teresita Aguiar-Fernández[1], Aydiloide Bernal-Villegas[1], Miguel Suárez-Castellá[1], Justo González-Olmedo[2] y Midiala Bermúdez-Calimano[1]

1. Instituto Nacional de Investigaciones en la Caña de Azúcar. UEB Villa Clara (INICA VC). Autopista Nacional, km 246, Ranchuelo. Villa Clara, Cuba.
*rafael.kosky@inicavc.azucuba.cu
2. Instituto de Investigaciones en Plantas Proteicas y Productos Bionaturales (CIPB). La Lisa, La Habana, Cuba.

RESUMEN

A iniciativa del Comandante en Jefe Fidel Castro, se comenzaron los trabajos de investigación para el uso de otras especies de plantas arbustivas como fuente de proteína para el alimento animal, de forma directa o para la elaboración de piensos. Sin embargo, estas nuevas especies, para su generalización en el país, necesitan de semilla y son necesarios protocolos eficientes para obtener plantas que permitan la expansión de estas a lo largo de todo el país. Este trabajo tiene como objetivo desarrollar estrategias de trabajo para generalizar, a partir de estacas, semillas botánicas y biotecnológicas de las especies de plantas proteicas Morera, *Tithonia, Cratylia* y la forrajera King grass CT-115. Los resultados, hasta el presente, permitieron desarrollar protocolos eficientes (95 %) de brotación y enraizamiento de estacas, a partir de plantas madre de las especies Morera cv Criolla y Yu-12 y la Tithonia. Unido a la germinación de semillas botánicas de Morera cv. Yu-1, en tubetes 2, con una mayor rapidez en la germinación y porcentaje de germinación del 95 %, con la utilización de los bioestimulantes VIUSID-Agro o Fitomás-E más Bioenraiz. Además de la implementación de protocolos *in vitro* en la Morera cv. IZ 16-8 y el pasto King grass CT-115 con su escalado a nivel productivo en Biofábrica.

Palabras clave: propagación *in vitro*, plantas proteicas, piensos, estaquillado, King grass.

ABSTRACT

At the initiative of Commander-in-Chief Fidel Castro, research work began on the use of other bushy plant species as a source of protein for animal feed directly or for the production of feed. However, these new species for their generalization in the country need seed, for which efficient protocols are necessary to obtain plants that allow their planting throughout the country. The objective of this work was to develop work strategies for the propagation from cuttings, botanical and biotechnological seeds of the protein plant species Morera, Tithonia, Cratylia and the forage King grass CT-115. The results to date allowed the development of efficient protocols (95 %) for sprouting and rooting of cuttings from mother plants of the species Morera cv Criolla and Yu-12 and Tithonia. Together with the germination of botanical seeds in tubes of Morera cv. Yu-12 with faster germination and germination percentages of 95 % using the biostimulants VIUSID-Agro or Fitomas-E more Bioenraiz. In addition to the implementation of *in vitro* protocols in Morera cv. IZ 16-8 and the King grass CT-115 with its scaling up to a productive level in Biofactory.

Key words: *in vitro* propagation, protein plant, feed, staked, King grass.

INTRODUCCIÓN

En el año 2018 Cuba gastaba más de 300 millones de dólares en la compra de trigo, soya y maíz, destinados a la alimentación animal. En la actualidad los precios de estas materias primas han aumentado en el mercado internacional y, por otra parte, la productividad agrícola de la soya y el maíz, en el país, registran niveles inferiores a otras regiones del mundo, según ONEI (1).

Las plantas proteicas como la moringa, la morera y la tithonia se reconocen por el alto valor nutricional de sus follajes para el ganado. En América Latina y el Caribe existen numerosas investigaciones acerca de la obtención de "alta biomasa de follaje" de estas plantas, para la alimentación de animales monogástricos, como cerdos, aves y conejos, y también para las especies rumiantes, segun indican (2,3).

Debido a la alta concentración de proteínas en el follaje de estas plantas, su empleo implica la reducción de otros recursos alimenticios convencionales y costosos como la harina de soya, comunes en la dieta de animales monogástricos. Sus propiedades medicinales favorecen la salud de los animales, por lo que se requiere de menos medicamentos. Varios estudios registran una alta productividad animal asociada con la introducción de plantas proteicas en su alimentación y destacan, además, las facilidades para su cultivo.

El cultivar CT-115, es una planta forrajera obtenida a partir del King grass en los laboratorios del Instituto de Ciencia Animal (ICA), por el método de cultivo de tejidos. Incrementar las áreas de pastos mediante la introducción de este cultivar constituye una problemática a resolver por este proyecto. La poca disponibilidad de semilla en la actualidad es uno de los impedimentos más importantes, su reproducción *in vitro*, acelera la disponibilidad de semilla al poder contar con plantas de este cultivar.

Este trabajo tiene como objetivo desarrollar estrategias para la propagación, a partir de estacas, semilla botánica y biotecnológica de las especies de plantas proteicas Morera, Tithonia, Cratylia y el pasto King grass CT-115.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo comenzó en el mes de abril del año 2020, con la construcción de un vivero y la entrega de las primeras posturas de la especie morera (cultivar Criolla y Yu-12), en la estación del Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes (IIPF), de Villa Clara. Posteriormente, se recibieron materiales de la antigua ECTI Sierra Maestra, hoy CIPB, de los cultivares de Morera (*Morus alba* L.) IZ 16-8 y de *Cratylia* (*Cratylia argentea* (Desv) O. Kuntze) semillas de los cultivares Veranera, así como la Tithonia (*Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray)* cv. Occidental 16.

Las investigaciones se enmarcan en dos líneas de trabajo, por una parte, el desarrollo de protocolos para el estaquillado; por otra parte, la propagación *in vitro* para su escalado en la biofábrica. Para la primera se estudiaron diferentes sustancias estimuladoras del enraizamiento, para incrementar los porcentajes de eficiencia. Con el bioproducto BIOENRAIZ (CIDCA, Cuba) se alcanzó el mejor resultado, combinado con los bioestimulantes VIUSID-Agro (Catalysis, España) o Fitomás-E (CIDCA, Cuba).

Un objetivo clave para este esquema de propagación por estacas es contar con un vivero de 5000 plantas, con plantas madre proteicas (Morera, *Tithonia y Cratylia*), para poder producir, en un año, 200 000 plantas y obtener las estacas necesarias para realizar la producción de posturas y su venta en bolsas o tubetes a los productores. En la actualidad existen 3103 plantas madre de ambas especies, con edades entre los 8 y 16 meses de cultivo.

Para la propagación por estacas se evaluaron diferentes tipos de envases (bolsas de polietileno y tubetes), por lo que se desarrolló, por parte de dos empresas del Grupo Empresarial AZCUBA (ZETI y AZUTECNIA), la producción y diseño de variantes de porta-tubetes y tubetes, unido a un cuentapropista (TCP) de Santa Clara, Villa Clara.

En el caso de la propagación *in vitro* se comenzó, primero, a establecer un Banco de Donante en condiciones semicontroladas. El objetivo era tener aisladas, rejuvenecidas y con mayor cuidado a las plantas madre de las especies Morera, *Cratylia y King grass* CT-115 para la toma de las yemas de estas especies., como material de inicio de las investigaciones, para el desarrollo de protocolos de propagación por biotecnología, Además, es importante señalar que son especies leñosas de lento crecimiento, lo cual justifica el uso de las técnicas biotecnológicas para la obtención rápida de material de propagación inicial.

Banco de donantes semicontrolado

Estuvo ubicado en las áreas de la UEB INICA, de Villa Clara, constituido por una estructura metálica de hierro galvanizado, cubierta con material plástico (filme de polietileno) transparente (Rafia). La altura de la estructura era de 4.00 m en la parte alta y 2.20 m la baja. Por encima de este se encontraba una malla semisombra de 50 % (Sarán), para reducir la intensidad lumínica y evitar quemaduras en las hojas, por temperaturas muy altas dentro del banco de donante. Además, fueron cubiertos sus lados con una malla plástica antiáfidos. Y el piso fue todo cubierto con zeolita.

Se utilizaron, para la siembra del material vegetal, tanques de plástico, con una capa de grava en el fondo y rellenos con una mezcla de compost de cachaza y zeolita 3:1 (v/v) para un volumen de 20 m^3, se colocaron 20 tanques por cultivar. La protección fitosanitaria con badén para los pies y un lavamanos con formol o hipoclorito de sodio, al 0.1 %. El riego fue por microaspersores, con frecuencia diaria, entre dos y tres veces, sobre todo en el horario del mediodía y la tarde, cuando las temperaturas son más altas.

Condiciones de cultivo del Banco de donantes semicontrolado

Densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF), en un rango de 209.4 a 1036 µmol m^{-2} s^{-1}, medido con el auxilio de un luxómetro digital (modelo Multimetrix LM 76. E.U.A). Los valores de Humedad relativa (HR) fueron: un mínimo de 49.5 % y un máximo de 81.9 %. La temperatura presentó valores: mínima de 27.1 °C y máxima de 39 °C, se utilizó para su medición un termohigrómetro (modelo Ebro Electronic® TFH 620, EUA).

De las plantas madre, a partir de los 6 meses de cultivo, se comenzaron a colectar las yemas laterales, con ayuda de una tijera de podar. En el laboratorio se realizaron los diferentes pasos del procedimiento de desinfección: lavado con detergente doméstico, al que se le adicionaron de 3-5 mL por cada 250 mL de agua y enjuagues posteriores, con agua, para eliminar el detergente. Después se realizó una primera desinfección de los cilindros de hojas jóvenes de aproximadamente, 10 cm de longitud, en recipientes previamente esterilizados con etanol al 70 %, durante un minuto.

En la cabina de flujo laminar, con el auxilio de una pinza estéril, se eliminó el etanol y fueron colocadas en una solución de hipoclorito de sodio al 3.0 % (v/v), durante 15 minutos. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua desmineralizada estéril y, finalmente, los cilindros de hojas fueron colocados en un frasco estéril con una solución de 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico.

Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo basal compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100 %, vitaminas Heinz y Mee (1969), 30 g L^{-1} de sacarosa y gelificado con 7 g L^{-1} de agarE (BIOCEN, Cuba). El pH se ajustó a 5.8 con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N) previo a la esterilización, mediante ebullición. Se estudiaron diferentes tipos de medios de cultivos para cada una de las fases de la propagación *in vitro,* para las especies Morera cultivar IZ16-8 y Yu 12, así como la *Cratylia* cv. Veranera.

Esterilización del medio y frascos de cultivo e instrumental

La esterilización del medio de cultivo se realizó a través del método físico, mediante la ebullición a 100 ˚C, durante cinco minutos y se dosificó en los frascos de cultivo de plástico traslucidos no

autoclavables. Estos fueron esterilizados por el método químico con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.05 % (v/v).

Los platos metálicos utilizados para el trabajo dentro de la cabina de flujo laminar se esterilizaron en la estufa a 180 ºC, durante 2 h. A partir de este procedimiento, todo el trabajo se desarrolló en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar horizontal. El instrumental (pinzas y bisturíes), se desinfectó en un esterilizador eléctrico, modelo DENT-EQ (Alemania).

Condiciones de cultivo *in vitro*

Los tubos de cultivo con los ápices y segmentos de todos los experimentos se colocaron en cámara de crecimiento climatizada, a una temperatura de 27±2 °C, con luz solar, con un fotoperíodo de 12.5/11.5 h de luz/oscuridad, con un rango de densidad de Flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) entre 47.1 y 64.6 µmol m^{-2} s^{-1}; medido con un luxómetro PCE-174 Instruments (España). En el caso de los ápices, los primeros siete días de cultivo se mantuvieron en condiciones de oscuridad total y temperatura de 27±2 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estrategias desarrolladas

Estaquillado

En el desarrollo de protocolos para el estaquillado, se estudiaron diferentes sustancias estimuladoras del enraizamiento, para incrementar los porcentajes de eficiencia. Con el bioproducto BIOENRAIZ (CIDCA, Cuba) se alcanzó el mejor resultado, combinado con el bioestimulante VIUSID-Agro (Catalysis, España) o Fitomás-E, además del uso de tijeras de podar. Los porcentajes de brotación de las yemas y el enraizamiento de estas, superaron el 95 % en los cultivares de Morera, Criolla, Yu-12 y en la Tithonia (figura 1).

Figura 1. Protocolo para el estaquillado de las especies de plantas proteicas Morera (*M. alba* L.) cv. Criolla y *Tithonia* (*Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray)* cv. Occidental 16, a partir de plantas madre, cultivadas en viveros.

Semillas botánicas

Las semillas botánicas de Morera cultivar Yu-12 fueron embebidas toda la noche en una solución de VIUSID-Agro 0.8 mL L^{-1}; posteriormente, fueron colocadas en tubetes, se adicionaron una o dos semillas por cada uno. A los 30 días de cultivo se alcanzó un 96.0 % de germinación (figura 2).

Figura 2. Protocolo para la obtención de posturas de Morera cv. Yu-12, a partir de semillas botánicas.

Semillas biotecnológicas

En la especie Morera cv. IZ16-8 se desarrolló un protocolo autóctono sin formación de callo basal para la propagación *in vitro* de esta especie, se partió de explantes obtenidos de plantas madre, cultivadas en condiciones semicontroladas (figura 3). En la actualidad se encuentran en la fase de aclimatización las primeras plantas *in vitro,* para un total de 1 524 (figura 4). Además, se alcanzaron resultados positivos, a partir del escalado, con el empleo de los Sistemas de inmersión temporal tipo SETIS para semiautomatizar el proceso *in vitro* (figura 5). Estos resultados apoyan los informados por Pérez-Pérez *et al.* (4), al utilizar los SETIS para la multiplicación de esta especie, pero en el cultivar Criolla.

Figura 3. Banco de donante en condiciones semicontroladas, para el cultivo de las plantas madre de plantas proteicas donantes de los materiales vegetales, para su propagación por biotecnología.

Figura 4. Plantas *in vitro* de Morera (*M. alba* L.) cv. IZ 16-8 en condiciones de aclimatización *ex vitro*, en dos tipos de tubetes, a los 35 días de cultivo.

Figura 5. Sistemas de inmersión temporal tipo SETIS, empleados en las fases de multiplicación y enraizamiento, durante la propagación *in vitro* de la Morera (*M. alba* L.) cv. IZ16-8.

Especie Cratylia argentea (Desv) O. Kuntze

Establecimiento in vitro

Los mejores resultados se alcanzaron con la desinfección de las semillas, al combinar el etanol al 70.0 % con el hipoclorito de sodio al 3.0 %, durante 15 minutos de agitación, para la variable semillas sin contaminación. Sin embargo, para la variable semillas brotadas, el mejor tratamiento fue con un tiempo de exposición a NaClO de 10 minutos, al obtener un 50.0 % con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos (tabla 1 y figura 6).

Tabla 1. Efecto del tiempo de desinfección, con hipoclorito de sodio en las semillas botánicas de *Cratylia argentea* cultivar Veranera, a los 10 días de cultivo

Solución NaClO (%)	Tiempo (min)	Contaminación por microorganismos	Libres de contaminantes	Germinadas
3.0	5	55 %	45 %	20 % b
3.0	10	30 %	70 %	50 % a
.0	15	20 %	80 %	10 % c

Letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente, según prueba de proporciones para p≤0.05.

Después de separado el material contaminado, de las 39 semillas restantes germinaron 16, para un 41.02 %. El bajo porcentaje de germinación pudo deberse a la pérdida de viabilidad y calidad fisiológica, al no cumplir con los procedimientos requeridos en su proceso de secado y conservación (tabla 2).

Tabla 2. Evaluación de la sinergia de germinación de las semillas, en 4 semanas de cultivo

Semillas germinadas	7 días	14 días	21 días	28 días	Total
16 semillas	9 (56.2 %)	4 (25 %)	2 (12.5 %)	1 (6.3 %)	16 (100 %)

La germinación de las semillas se comportó de la siguiente forma: en los primeros 7 días germinó el 56.2 %, de 7 a 14 días el 25 %, de 14 a 21 días el 12.5 % y de 21 a 28 días el 6.3 %.

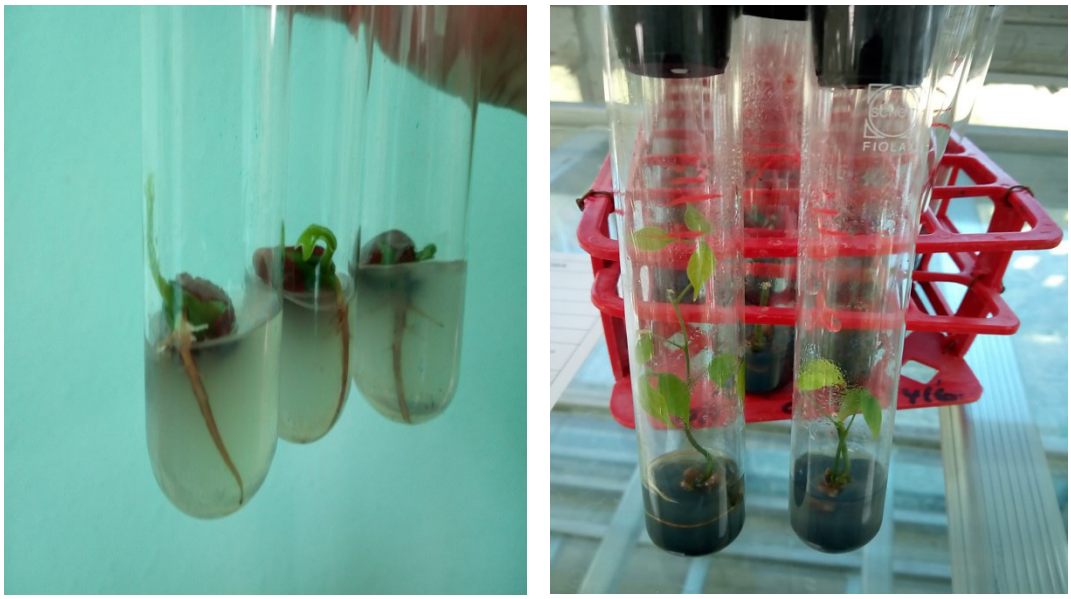

Figura 6. Germinación *in vitro* de las semillas de la especie de planta proteica *Cratylia argéntea* cv. Veranera.

También se desarrolló un protocolo para la multiplicación a escala comercial por vía biotecnológica del pasto King grass CT-115, a partir de discos de hojas y con la combinación de la embriogénesis somática con la organogénesis, que incluyó todas las fases del proceso de propagación *in vitro*. Este resultado constituye el primer informe, a nivel nacional e internacional, hasta el momento (figura 7).

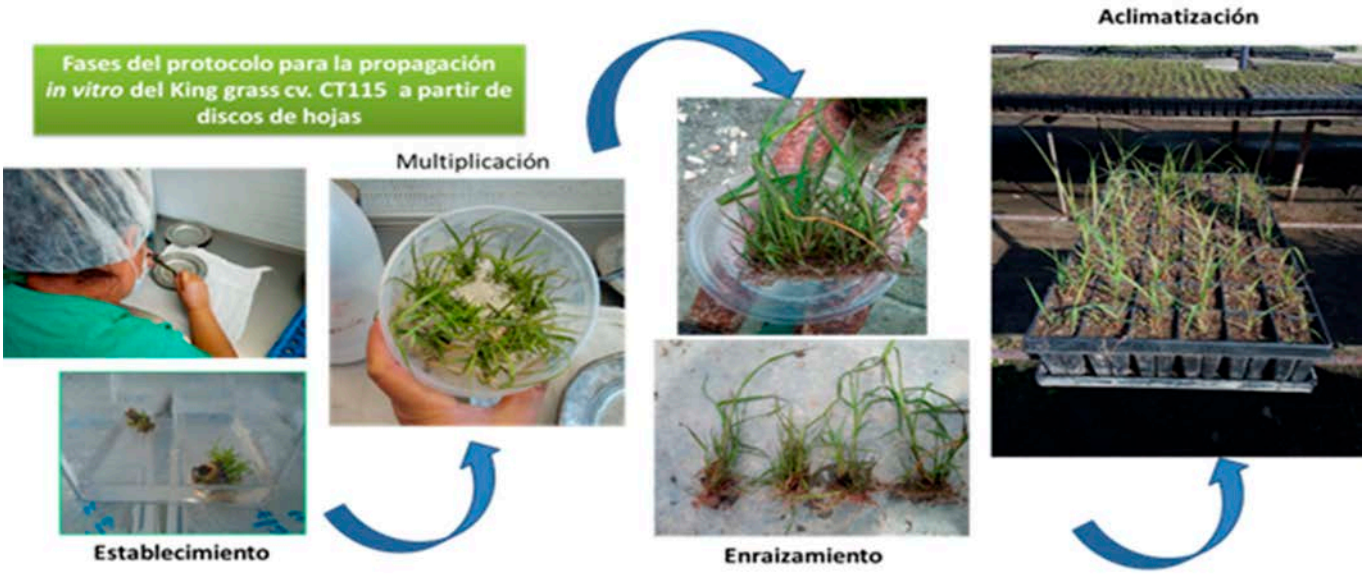

Figura 7. Protocolo para la propagación *in vitro* del pasto King grass CT-115 (*Pennisetum purpureum* L.), a partir de embriones somáticos obtenidos de los discos de hojas jóvenes.

La combinación de las tres estrategias ha permitido a la Biofábrica del Complejo Científico-Productivo de Biotecnología, producir un total de 195 415 plantas de las especies Morera, Tithonia y el pasto CT-115, durante un año y tres meses. Además, la producción del complejo puede contar con nuevos productos para su comercialización y, así, diversificar sus producciones.

CONCLUSIONES

Las estrategias desarrolladas constituyen alternativas viables para la producción de semillas de especies proteicas y forrajeras, de gran interés para el país, que permitirán incrementar las áreas para la producción de materia verde y la fabricación de piensos para los diferentes tipos de ganado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ONEI. Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca En: Anuario 2020 de la Oficina Nacional de Estadísticas e Información de la República de Cuba. Capítulo 9. 2021. 35p. htpp//onei.gob.cu
2. Martín G, García F, Reyes F, Hernández I, González E, Milera M. Estudios agronómicos realizados en Cuba en Morus alba. Pastos y Forrajes, 23 (3) 20-23, 2000.
3. Salas, J.; Agramonte, D.; Jiménez-Terry, F.; Pérez, M.; Collado, R. y Barbón, R. Propagación de plantas de *Morus alba* var. Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal. Biotecnología Vegetal. 11 (2):77-88,2011.
4. Pérez-Pérez, J.L.; Fonseca-Yero, M.; Bahi-Arevich M.; Silva-Pupo J.J. y Werbrouck S. *In vitro* multiplication of *Morus alba* L. Criolla variety in temporary immersion systems. Pastos y Forrajes. 43 (3): 221-229, 2020.