

# ASPECTOS ANATOMICOS Y FISIOLÓGICOS DE CULTIVOS IN VITRO DE *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón)

Orlando Torres Fernández (1)  
Tito J. Fandiño García (1)  
Margarita Perea Dallos (2)

## RESUMEN

Se cultivaron explantes de peciolo de *T. tuberosum* en medio Murashige & Skoog suplementado con auxinas y citoquininas. Se describe la formación de callo y la regeneración de organoides semejantes a raíces obtenidos a partir del subcultivo. Vástagos obtenidos mediante micropropagación, se incubaron a temperaturas de 18°C y 22°C, en medio MS para enraizamiento, observándose diferencias notorias en la morfología de las raíces.

## SUMMARY

Petiole explants of *T. tuberosum* were cultivated in Murashige & Skoog medium supplemented with auxins and cytokinins. Callus formation and abnormal morphogenesis obtained from subcultures are described. Shoots obtained by micropropagation were incubated at 18°C and 22°C in medium MS for rooting. Notorious differences in root morphology were observed.

## INTRODUCCION

El cultivo de tejidos vegetales, además de ser un recurso de la biotecnología que ha permitido avances significativos en la solución de problemas de propagación y mejoramiento de plantas de importancia económica, constituye un medio que facilita la investigación básica en diferentes áreas de la morfología, fisiología y genética vegetal. En este trabajo se presenta la segunda parte de un estudio de cultivo de tejidos de la especie: *Tropaeolum tuberosum* ("navio", "cubio", "añú").

---

(1) Departamento de Biología, Universidad Nacional Apdo. Aéreo No. 23227

(2) Profesora asistente, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 23227, Bogotá.

*T. tuberosum* es una planta herbácea originaria de los Andes, en donde se cultiva para alimentación desde antes de la llegada de los españoles (Pérez, 1956). El principal producto aprovechable es su tubérculo, llamado popularmente "cubio" en la Sabana de Bogotá, en donde el mercado para el año de 1980 se calculó en unas 500 toneladas/mes (Gonzalez y Obando, 1980)

Los análisis de la composición química del tubérculo de *T. tuberosum* demuestran que posee buenas cualidades como alimento; su proteína contiene todos los aminoácidos esenciales, excepto la histidina; posee alto contenido de vitamina C y se le considera mejor alimento que la yuca y similar a la papa. Igualmente se cree que el tubérculo es apropiado para la industria de la galletería (González y Obando, 1980).

Un estudio detallado de la historia del cultivo y de la importancia socioeconómica de *T. tuberosum*, lo presenta Villamizar (1985).

Teniendo en cuenta las deficiencias nutricionales existentes en grandes núcleos de la población colombiana, es urgente llevar a cabo estudios de aquellos productos que, como el cubio, pueden constituirse en alternativas para la alimentación. Mediante el cultivo de tejidos vegetales es posible mejorar la productividad e inducir variaciones genéticas que permitan obtener productos de mayor calidad. Para *T. tuberosum* no se han reportado trabajos en Cultivo de Tejidos, excepto el ya publicado por los autores (Fandiño et al., 1987).

El presente artículo trata de diferentes aspectos de la anatomía y fisiología del desarrollo de los callos, así como de la morfonénesis a partir de los mismos. Igualmente se describe el efecto provocado por la diferencia de temperatura sobre el proceso de enraizamiento "in vitro".

### MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con plantas cultivadas en predios de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Se tomaron hojas jóvenes, las cuales se trasladaron al laboratorio, en donde se lavaron con agua y Teepol. Para inducción de callo, se separaron explantes de peciolo de aproximadamente 0.5 cm. de longitud. Se desinfectaron sumergiéndolos en Etanol 70% durante un minuto y luego en hipoclorito de sodio 1% durante dos minutos. Después de enjuagarlos con agua destilada esteril, se colocaron en el medio de cultivo dentro de frascos de vidrio de 40 ml. Las "siembras" de los explantes se hicieron en un ambiente aséptico dentro de una cámara de flujo laminar. Para la micropopagación, se separaron yemas axilares, las cuales se llevaron al medio del cultivo siguiendo un procedimiento similar.

En todos los cultivos se utilizó un medio básico conformado por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y sacarosa según Murashige y Skoog (1962), el cual se ajustó a un PH inicial de 5.8 y se solidificó con Agar-Agar 7g/litro. Finalmente se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 atmósferas de presión durante 20 minutos.

El medio básico se suplementó con reguladores de crecimiento vegetal, de acuerdo con el propósito de los diferentes cultivos.

Para inducción de callo se emplearon combinaciones de Kinetina (6-fur-furilaminopurina) en un rango de 0.1 a 5 ppm con cada una de las siguientes auxinas: 2.4-D (Acido 2,4-diclorofenoxiacético) 0.5 a 10ppm; AIA (Acido Indolacético) 0.01 a 2ppm y ANA (Acido Naftalenacético) 0.5 a 2 ppm. Los

cultivos se incubaron en condiciones de luz u oscuridad a una temperatura de 22°C-25°C.

El subcultivo de callos para morfogénesis, se efectuó en medio básico con combinaciones de ANA 0.5-2 ppm y BAP (6-bencilamino purina) 0.5-3 ppm, a la misma temperatura y con fotoperíodo controlado de 16 horas diarias a 2.000 lux.

En el cultivo de yemas, para la micropropagación, se utilizó medio básico suplementado con la citoquininas BAP y Kinetina (6-furfurilaminopurina), en concentraciones de 0-5 ppm, fotoperíodo de 16 horas/día a 2.000 lux, y se ensayaron tres temperaturas diferentes: 18°C, 22°C y 26°C.

El enraizamiento de vástagos obtenidos por propagación "in vitro", se llevó a cabo en medio básico al cual se le adicionó ANA (1-2 ppm). Se mantuvo el mismo fotoperíodo y se ensayaron temperaturas de 18°C y 22°C.

Los resultados preliminares de estos experimentos se presentaron en publicación anterior (Fandiño et al., 1987)

Los callos seleccionados para este estudio se mantuvieron en cultivo prolongado (90-100 días) en oscuridad, en medio básico con concentraciones relativamente altas de 2,4-D (5-10 ppm) y Kinetina (3-5 ppm), a temperatura constante de 25°C.

Para los estudios anatómicos durante la formación del callo, se observó primero la organización inicial de los tejidos del peciolo y se tomaron explantes, cada 5 días, para analizar los cambios histológicos ocurridos. Igualmente se estudió la anatomía de los organoides regenerados a partir de los callos.

Las muestras se fijaron en FAA durante 12 horas y se sometieron a los procedimientos corrientes de deshidratación con Etanol e imbibición en parafina para obtener secciones de 7-10 micras. Estas se colorearon con Fast-Green y Hematoxilina. También se hicieron cortes de material fresco a mano alzada, utilizando Safranina como colorante.

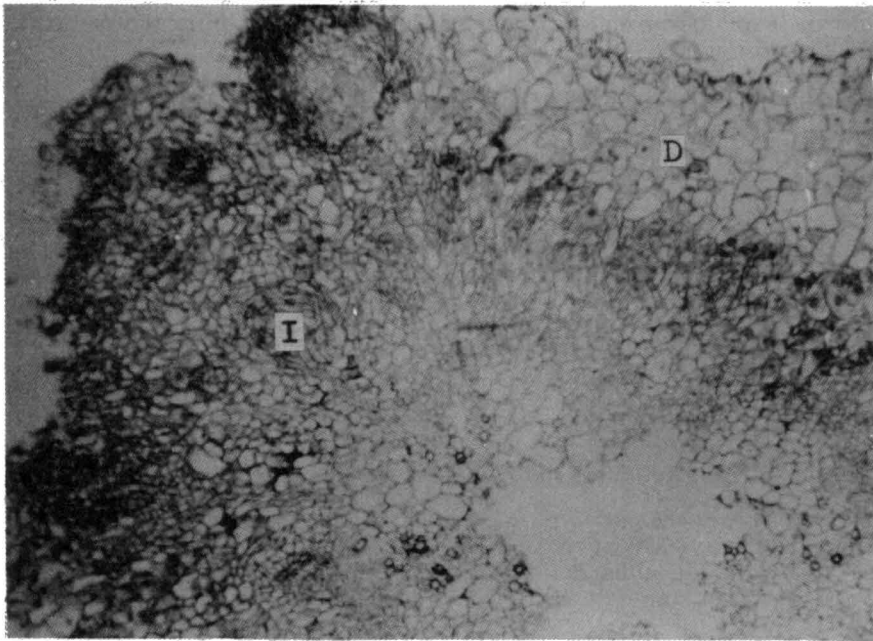
Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Formación del Callo

El peciolo de *T. tuberosum* presenta un lumen central hacia la parte basal, el cual va siendo ocupado por tejido parenquimático a medida que se acerca a la lamina foliar. Los haces vasculares en número de 8 a 10 están distribuidos hacia la periferia rodeados por tejido parenquimático.

A los 5 días los explantes comienzan a ensancharse a manera de huso. El examen histológico demuestra pequeñas agrupaciones de células indiferenciadas dentro de parénquima. A los 10 días de cultivo hay gran proliferación de estos núcleos meristemáticos. A los 20 días aún se conserva la forma alargada del explante. El examen histológico (Fig 1) muestra que ha desaparecido toda evidencia de tejido organizado, y los constituyentes celulares presentan una composición heterogénea. Se observan zonas con células grandes y vacuoladas de forma irregular y zonas con pequeñas células isodiamétricas de tipo meristemático.



**Fig. 1.** Sección transversal de un explante de peciolo de *T. tuberosum* a los 20 días de cultivado. Obsérvese que ha desaparecido la organización de los tejidos. (I) Células indiferenciadas. (D) Células diferenciadas. 32X.

Esta estructura interna del callo corresponde a la descripción hecha por otros autores (Butcher e Ingram, 1876). Los callos consistentes de parénquima uniforme son muy raros; ej: *Agave* y *Rosa* (Narayanaswamy, 1977).

Nuestras observaciones permitieron establecer que las células parenquimáticas son las reponsables de la formación de callo a partir de explantes de peciolo de *T. tuberosum*. Nassuth et. al. (1980), encontraron que la formación del callo en explantes de tallo de *Coffea canephora* se inicia a partir de todo el tejido parenquimático localizado entre la epidermis y el cilindro central. No observaron actividad del cambium vascular. Ellis y Borman (1971) determinaron que las células del cambium vascular dieron origen al callo en explantes de tallo de *nicotiana Tabacum*. Raju y Mann (1970) demostraron para *Echeveria elegans*, mejor respuesta de inducción y formación de callo, en hojas jóvenes sin tejidos vasculares diferenciados, que en hojas con tejido vascular diferenciado.

Es posible obtener callos en cultivos "in vitro" de diferentes tejidos tales como epidermis, parénquima cortical y medular de tubérculos, cotiledones, endospermo, ovocélulas y otros (Narayanaswamy, 1977). La nulipotencialidad o totipotencialidad varía de una especie a otra y de un tejido a otro, de acuerdo con la condiciones de cultivo, origen del explante y edad de la planta (Tran Thanh Van, 1981).

### MORFOGENESIS

Callos de 90-100 días subcultivados para morfogénesis (fig. 2) dieron origen, después de 20-30 días, a unos organoides de color blanco-amari-llento, de forma cónica o cilíndrica, los cuales crecieron preferencialmente por encima del medio de cultivo (fig. 3). De acuerdo con Esau (1965), estos

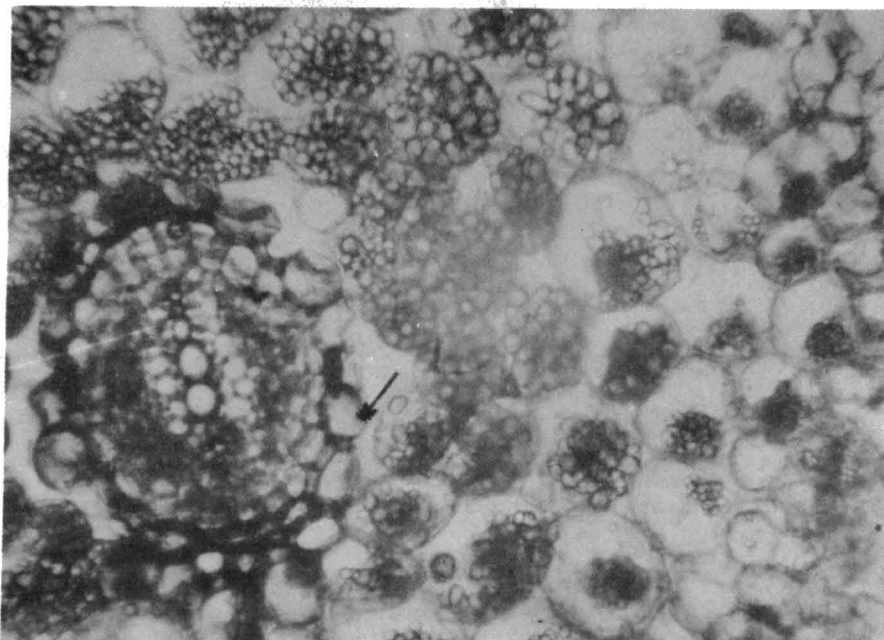


**Fig. 2.** Callo de 90 días obtenido a partir del cultivo de un explante de peciolo.



**Fig. 3.** Organoides regenerados después de 30 días a partir del subcultivo de callos.

organoides revelan una estructura interna con características similares a las de muchas raíces (fig.4 ). Se destaca el cilindro central con sistema xilemático del tipo diarco y unas células con paredes engrosadas semejantes a la endodermis de raíces de monocotiledóneas y dicotiledóneas que no presentan crecimiento secundario.



**Fig. 4.** Sección transversal de los organoides regenerados a partir de callos. Nótese el cilindro vascular con xilema tipo diarco. La flecha indica células con paredes engrosadas del tipo endodérmico. 100X.

Se presentó también formación de verdaderas raíces (organogénesis) delgadas, con abundantes pelos que crecían generalmente dentro del medio de cultivo.

Si bien el objetivo principal del cultivo de callos es la regeneración de plantas con variaciones genéticas aprovechables, mediante los procesos de organogénesis y/o embriogénesis, esto no siempre es posible debido a que las células han sido sometidas a una serie de procesos traumáticos desde el momento de la excisión del explante. Alteraciones genéticas y fisiológicas pueden dar origen a formas anormales como las obtenidas en el presente estudio.

Después de la excisión, ocurren fenómenos tales como: incremento de la permeabilidad de la membrana, destrucción o síntesis de hormonas de crecimiento y la consecuente activación genética diferencial, cambios en la actividad de la peroxidasa y en el metabolismo de los compuestos fenólicos, y muchos otros efectos complejos que afectan el "estado celular inherente" (Tran Than Van, 1981).

En la mayoría de los casos, la capacidad de regeneración de vástagos disminuye con la edad y el subcultivo, pero la capacidad de formar raíces puede persistir por años (Narayanawamy, 1977). Loewenberg (1969) resal-

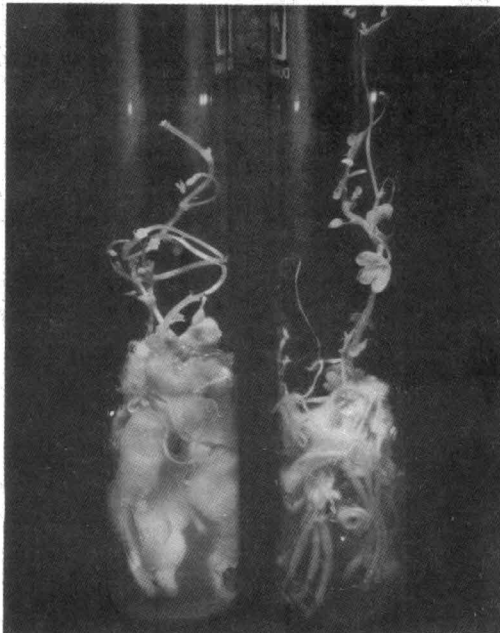
tó la capacidad de callos de *Cyclamen persicum* para regenerar vástagos y raíces después de siete años de subcultivo.

Otro factor que afecta seriamente la organogénesis a partir de callos es la utilización de 2-4-D, especialmente en altas concentraciones. El AIA y el ANA son auxinas más adecuadas para mantener la estabilidad cromosómica (Nickell y Torrey, 1969). Para *T. tuberosum* no fue posible obtener callos empleando estos dos últimos reguladores de crecimiento, aunque faltó un estudio más profundo al respecto.

El 2,4-D es ampliamente utilizado en la inducción de callo, pero los explantes deben transferirse en corto tiempo a un medio con citoquininas para mantener el potencial de regeneración del vástago. El mantenimiento de la estabilidad cromosómica en cultivos de callos y células en suspensión constituye, en el momento, uno de los principales objetivos en las investigaciones de organogénesis "in vitro" (Flick, et al., 1983).

### ENRAIZAMIENTO

Los vástagos obtenidos por micropropagación a partir de yemas que crecieron en el medio para enraizamiento a una temperatura de 18°C, desarrollaron numerosas raíces delgadas con abundantes pelos, mientras que los vástagos incubados a 22°C dieron origen a raíces tuberosas de un aspecto similar al del tubérculo que constituye la parte comestible de *T. tuberosum* (fig. 5). La temperatura es un factor físico importante que influye en el desarrollo "in vitro" de diferentes tejidos y órganos vegetales, debido a su acción sobre los procesos enzimáticos del metabolismo celular (Butenko, 1968).



**Fig. 5.** Morfología de raíces que crecieron a diferentes temperaturas. Izquierda, raíces tuberosas desarrolladas en cultivo a 22°C. Derecha, raíces delgadas (filiformes) obtenidas en cultivo a 18°C.

Es importante anotar que *T. tuberosum* crece en lugares de bajas temperaturas en donde la producción de tubérculos es normal. En contraste, la tuberización "in vitro" es favorecida por un incremento moderado de la temperatura. Este hecho constituye una demostración significativa de los fenómenos complejos que se presentan durante los procesos efectuados en la aplicación del cultivo de Tejidos Vegetales.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se estableció que el tejido parenquimático fue el responsable de la inducción y formación de callo en los cultivos "in vitro" de explantes de peciolo de *T. tuberosum*.

2. Se obtuvo morfogénesis anormal a partir del subcultivo de los callos, probablemente como consecuencia del prolongado cultivo de los mismos en un medio con concentraciones de 2,4-D relativamente altas.

3. Se encontró que la temperatura ejerce una influencia notoria sobre la morfología del enraizamiento "in vitro" de vástagos obtenidos por micropropagación.

4. Es importante continuar los estudios encaminados a obtener regeneración de plantas a partir de callos y cultivos celulares de esta especie, con el propósito de inducir variaciones genéticas que permitan, en un futuro cercano, el mejoramiento de la calidad del producto comestible, y con ello, incrementar su comercialización. Otros productos de calidad nutricional semejante o inferior, como la papa y la yuca, son objeto de programas de mejoramiento por parte de investigadores del área de cultivo de tejidos en entidades internacionales tales como el CIP y el CIAT.

5. *T. tuberosum* es una especie que presenta gran facilidad y diversidad de respuestas en condiciones de cultivo "in vitro", por lo tanto, se recomienda utilizarlo como material didáctico en cursos de capacitación.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a los profesores Angela de Barrera, Hernán Cardozo y Jesús Norato del Departamento de Biología por su constante apoyo durante la realización de este trabajo, y al señor Fabio Ramírez del Laboratorio de Fisiología Vegetal por su colaboración.



---

**BIBLIOGRAFIA**

- BUTCHER, D. & D. INGRAM. 1976. Plant Tissue Culture. Studies in Biology N° 65. Edward Arnold Publishers. London.
- BUTENKO, R.G. 1968. Plant Tissue Culture and plant Morphogenesis. Israel Program for Scientific Translations Jerusalem.
- ELLIS, R. & C. BORMAN. 1971. Anatomical aspects of growth proliferation in *Nicotiana Tabacum* tissue cultures in vitro. J.S. Afr. Bot. 37(2): 109-126.
- ESAU, K. 1965. Plant Anatomy. John Wiley and sons Inc. New York.
- FANDIÑO, T., O. TORRES, y M. PEREA. 1987. Morfogénesis y Micropropagación de *Tropaeolum tuberosum*. Boletín científico de la Asociación Colombiana de Estudios vegetales in vitro-ACEVIV. Vol. 1. N° 2. En prensa.
- FLICK, C., D.EVANS, & W. SHARP. 1983. Organogenesis. In: Handbook of plant cell culture. Vol. 1. Techniques for propagation and Breeding. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. ammirato and Y. Tamada. (Eds). pp.13-81.
- GONZALEZ, G. y R.OBANDO. 1980. Estudio preliminar de la composición química del cubío. Trabajo de Grado. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 111 p.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR PLANT TISSUE CULTURE. 1985. Newsletter No.45: 15-22.
- LOEWENBERGS, J. 1969. Cyclamen callus culture. Can J. Bot 47: 2005-2067.
- MURASHIGE, T & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497.
- NARAYANASWAMY, S. 1977. Regeneration of plants from Tissue Cultures. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and organ Culture. Reinert, J. y Y. Bajaj (Eds). pp. 179-206.
- NASSUTH, A, T. WORMER, F. BOUMAN, & G. STARITSKY. 1980. The histogenesis of callus in  *Coffa canephora* stem explants and discovery of early embryoid initiation. Acta. Bot. Neerl. 29(1): 49-54.
- NICKELL, L. & J. TORREY. 1969. Crop improvement through plant cell and tissue culture. science 166:1068-1069.
- PEREZ, E. 1956. Plantas Útiles de Colombia. Sucesores Rivadeneira S.A. Madrid.
- Rajú, M. & H. MANN. 1970. Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*, Anatomy and Regeneration of leaves in sterile culture. Can J.Bot. 48:1887-1891.
- TRAN THANH VAN, K. 1981. Control of morphogenesis in "in vitro" cultures. Ann. Rev.Plant. Physiol. 32:291-311.
- VILLAMIZAR, M. 1985. Aporte al conocimiento de: *Ullucus tuberosos*, *Oxalis tuberosa* y *Tropaeolum tuberosum*. Trabajo de grado. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 148 p.