

Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp.

In vitro rooting of *Dioscoreas* sp.

Irma Quintero*, Janer Polo*, Alfredo Jarma**, Amaury Espitia***

RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Córdoba en el año 2000 con el objetivo de evaluar el efecto del ácido naftalenacético (ANA) en el medio de cultivo sobre el enraizamiento *in vitro* de tres cultivares de ñame (*Dioscorea* sp.). Se estudió el efecto de cuatro concentraciones del regulador de crecimiento (0, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/l) sobre tres cultivares de ñame (Diamantes-22, 003 y 005). Se empleó un experimento trifactorial con diseño aleatorio y 20 repeticiones; cada unidad experimental estuvo conformada por un recipiente de vidrio que contenía el medio de cultivo y el explante (segmento nodal). Las variables consideradas fueron número y grosor de raíces, oxidación del medio de cultivo y producción de callo. Los resultados indicaron que tanto la hormona como el genotipo tuvieron efecto sobre todas las variables consideradas en el estudio y que la interacción fue importante ($P < 0.05$) para las variables producción de callo y oxidación del medio de cultivo. El cultivar 005 registró los mayores valores de número y grosor de raíces. Se pudo determinar además que al aplicar concentraciones de 0.6 y 0.9 mg/l de la auxina, la emisión de raíces y el grosor de las mismas registró significativamente mayores valores, independientemente de la accesión.

Palabras clave: ñame, cultivo de tejidos, enraizamiento, ANA

ABSTRACT

The Universidad de Córdoba's Vegetal Tissue Culture Laboratory evaluated the effect of naphthalenacetic acid (NAA) on *in vitro* rooting of three yam cultivars (*Dioscorea* sp.) in 2000. The effect of four hormone levels (0, 0.3, 0.6 and 0.9 mg/l) was studied on three yam cultivars (Diamantes-22, 003 and 005). A random experimental design was used employing 4x3 factorial arrangement and 20 repetitions; each experimental unit consisted of a glass receptacle containing the culture medium and the explant (one segment nodal). The variables considered were the number of roots and their thickness, culture medium oxidation and callus production. Findings showed that both the hormone and genotype had an effect on all those variables considered in the study and interaction was significant ($P < 0.05$) for callus production and culture medium oxidation. The 005 cultivar showed the greatest root number and thickness values. It was also determined that when a 0.6 and 0.9 mg/l dose of auxin was applied, root production and thickness registered significantly greater values, independently of accession.

Key words: yam, tissue culture, rooting, NAA

INTRODUCCIÓN

En Colombia, el cultivo del ñame (*Dioscorea* sp.) se ha visto afectado en los últimos años por algunas enfermedades y plagas, lo que ha ocasionado una drástica reducción del área cultivada. Además, en las dos últimas décadas, se registró una baja significativa en la producción,

causada principalmente por un fuerte ataque de antracnosis (Perea, 2000).

Ante la dificultad de aplicar el control químico a esta enfermedad, debido a los altos costos de los funguicidas para el pequeño productor, se pone de manifiesto la necesidad de adoptar técnicas complementarias de mejoramiento sanita-

* Ingeniero Agrónomo. Asistente Investigador, Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Córdoba, Tel: 7860022. Ext. 195. E-mail: irquipe@hotmail.com; genomajp@hotmail.com

** Ingeniero Agrónomo, M. Sc. Docente Investigador, Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Córdoba, Tel.: 7860022. Ext. 195. E-mail: ajarma 24@hotmail.com

*** Ingeniero Agrónomo. Coordinador Técnico Programa de Biotecnología Agrícola-PBA, Corpoica C.I. Turipaná Regional 2, Tel: 7640384. E-mail: aespitia@turipana.org.co

Recibido: Julio 18 de 2002. **Aceptado:** Octubre 15 de 2003.

rio y genético de las variedades comerciales del género *Dioscorea*, a través de la Biotecnología. El primer aporte de la Biotecnología al cultivo del ñame es la producción de semilla libre de patógenos. La obtención de plantas sanas mediante sistemas *in vitro* ofrece la posibilidad de producir material libre de patógenos, lo cual mejora de modo sustancial la productividad de un cultivo.

Los trabajos de investigación participativa que se realizan en la costa atlántica a través del Programa de Biotecnología Agrícola han permitido estandarizar técnicas de multiplicación de plantas *in vitro* de ñame libres de patógenos, lo que ha generado enorme interés debido a las ventajas obtenidas por estos sistemas, por ejemplo la uniformidad del material vegetal, el vigor, la velocidad de propagación y el número de plantas regeneradas.

Para lograr el éxito en la aplicación de estos sistemas de propagación clonal, es importante tener en cuenta el genotipo, su estado fisiológico, la selección del explante (parte de la planta), el suministro de nutrientes al medio de cultivo, el empleo de reguladores de crecimiento y las condiciones ambientales para el desarrollo de las plántulas (Perea, 2000).

La serie de procesos para la propagación *in vitro* de plantas de ñame se ciñe a la secuencia de eventos asociados a la multiplicación de la mayoría de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, destacadas por Murashige (1974 y 1977), citadas por Krikorian (1993); Usui *et al.* (1996); Pelacho *et al.* (2003) de la siguiente manera.

Etapa 0. Etapa inicial que comprende la selección de la planta madre y de una modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

Etapa I. Etapa de iniciación o de establecimiento, en la cual se establece el cultivo inicial o primario.

Etapa II. Etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.

Etapa III. Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante.

Etapa IV. Transferencia final a la etapa de medio ambiente.

Frecuentemente las condiciones específicas del medio o del cultivo aséptico están asociadas a cada una de las etapas mencionadas y, cuando sea posible, conviene organizar una estrategia de multiplicación basada en la interpretación de dichas condiciones (Krikorian, 1993).

La práctica de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia debido a que tiene como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces son fundamentales para lograr la transferencia de las vitroplantas a condiciones de invernadero (Ruscitti *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos autores han reportado inconvenientes al realizar esta práctica, lo cual sería lógico al considerar que existen respuestas diferenciales entre especies (Grout y Aston, 1977, citados por López, 2003).

Trabajos realizados por Aguas *et al.* (2000) indican que, para la etapa de aclimatación de vitroplantas de ñame, se deben emplear plantas con un buen número de raíces con el propósito de asegurar la supervivencia de las mismas al medio externo. Las plantas deben tener de dos a tres nudos y un sistema radicular desarrollado para ser trasplantadas al suelo (Hurtado, 1991).

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente el trasplante a un medio de cultivo modificado. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas (Villalobos y Torpe, 1993). Entre los efectos auxínicos en las plantas, se encuentra la formación de raíces (Barba, 1991). Numerosos estudios han demostrado que los contenidos de auxinas en el medio de cultivo inducen el crecimiento de este órgano a partir de segmentos de ñame (Mantell *et al.*, 1993).

La oxidación (segregación de sustancias de naturaleza fenólica de algunos tejidos vegetales con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes) se incrementa cuando el medio de cultivo contiene reguladores de crecimiento (Mroginski y Roca, 1993). La oxidación impide que las células del explante sintetizen algunas proteínas, que al no elaborarse, afectan la formación de estructuras y el crecimiento de las vitroplantas (Álvarez, 1998, citado por Puche y Rodríguez, 1998).

En las técnicas de cultivo de tejidos, y para cultivares de una misma especie como las *Dioscoreas*, la composición del medio del cultivo juega un papel fundamental en el desarrollo de plántulas *in vitro* en cada una de las etapas de la micropropagación. Esta investigación se planteó con el objetivo de determinar la concentración de la auxina ANA, que permitiera optimizar la formación de raíces en tres cultivares de ñame.

MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo inicial se estableció a partir de segmentos nodales de los tres cultivares de interés, los cuales, después de desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante diez minutos y enjuagados posteriormente con agua destilada estéril, se sembraron en frascos con medio constituido por las sales de Murashige y Skoog (1962), sin reguladores de crecimiento. Se adicionó tiamina (1 mg/l), mio-inositol (100 mg/l), sacarosa (30g/l) y agar (6 g/l). Se ajustó el pH a 5.8 con KOH 1N y se llevaron a autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

Los tejidos se incubaron con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a una intensidad de 2000 lux y a temperatura promedio de 28 °C, durante 60 días hasta obtener vitroplantas completas de 5 a 6 hojas o 4 a 5 segmentos nodales. Estas vitroplantas de los tres cultivares, se subcultivaron descartando aquellas que presentaron contaminación microbiana.

Se tomaron explantes con dos yemas, dejando 2 a 3 hojas con el propósito de obtener plantas completas a los 30 días. Éstas se sembraron en frascos con medio Murashige y Skoog con la adición de tiamina, mio-inositol, sacarosa y agar en las mismas concentraciones del primer medio de cultivo, adicionando las concentraciones de ANA de acuerdo con los objetivos del ensayo (tabla 1). Asimismo, las condiciones de pH, autoclavado e incubación fueron iguales a las de la primera etapa.

Se empleó un experimento trifactorial con diseño completamente aleatorio, con 12 tratamientos y

Tabla 1. Concentraciones de ANA evaluadas.

Cultivar	ANA mg/l			
003	0	0.3	0.6	0.9
005	0	0.3	0.6	0.9
Diamantes 22	0	0.3	0.6	0.9

20 repeticiones. Cada unidad experimental estuvo conformada por un recipiente de vidrio que contenía el medio de cultivo y el explante (segmento nodal). A los 30 días de la siembra, en 10 plantas seleccionadas al azar, se tomaron datos de:

Número de raíces totales. Se contó el número de raíces totales por planta. **Grosor de raíces.** Para medir esta variable, se empleó un nonio o vernier; el diámetro se expresó en milímetros. **Producción de callo.** Esta variable se midió utilizando una escala cualitativa de ausencia o presencia de callo, dándole valores de 0 a la primera y 1 a la segunda. Se expresó en porcentaje de plantas con formación de callo.

Oxidación del medio de cultivo. Se evaluó según la escala de niveles de oxidación diseñada por Quintero y Jarma (2002) en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Córdoba, en la cual se designaron 6 valores de acuerdo con la intensidad de oxidación (oscurecimiento) del medio de cultivo alrededor del explante. Esta escala tiene valores de 0 (medios no oxidados) a 6 (medio completamente oxidado), incluidos valores de 1, 2, 3, 4 y 5, los cuales hacen también referencia a niveles intermedios de oxidación. Los niveles se representan en una escala con intensidades en tono gris, igualmente espaciados desde el 15% (1) hasta el 90% (6), como se muestra en la figura 1. Se considera la semejanza que estas tonalidades tienen con la coloración real presentada en el medio de cultivo.

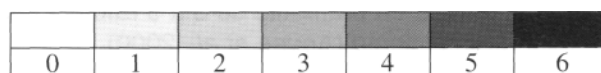


Figura 1. Escala para medir niveles de oxidación en medios de cultivo. Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Universidad de Córdoba (Quintero y Jarma, 2000)

Los resultados se analizaron por medio del programa SAS (Statistical Analysis System) de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba. Para los casos que fue necesario, se usó la prueba de comparación de medias DMS con nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que tanto la hormona como el genotipo tuvieron efecto sobre todas las variables consideradas en el estudio (número de raíces, grosor de raíces, producción de callo y oxidación del

medio de cultivo) y que la interacción de los dos factores fue importante para las variables producción de callo y oxidación del medio de cultivo (tabla 2).

Tabla 2. Cuadrados medios de cuatro variables evaluadas en el enraizamiento *in vitro* de tres cultivares de ñame, Montería, 2000.

Factor	C.M de las variables			
	No. Raíces	Grosor	Callo	Oxidación
Cultivar	70.15314**	3.72452*	0.6066**	3.86620**
Concentr	106.7279**	16.9806**	0.3638**	1.197279*
CulxDos	1.17618ns	0.66034ns	0.2097**	0.633141*

*Significancia al 5% (P < 0,05)
 **Significancia al 1% (P < 0,01)
 n.s. = no significativa (P > 0,05)

Número de raíces por planta

Al comparar el efecto del cultivar sobre el número de raíces, se encontró que esta variable fue significativamente superior en el cultivar 005 (p < 0.05) en comparación con 003 y Diamantes 22, como lo muestra la figura 2. Los valores observados en el estudio fueron 3.5 raíces en el cultivar 005; 2.7 en D-22 y 2 en el 003. El promedio de raíces obtenidas en el cultivar D-22 coincide con el trabajo realizado por Puche y Rodríguez (1998). Estos resultados se pueden considerar satisfactorios para la etapa de endurecimiento, en la cual se requiere que las plántulas tengan en promedio de 3 a 5 raíces para un buen prendimiento (Aguas *et al.*, 2000).

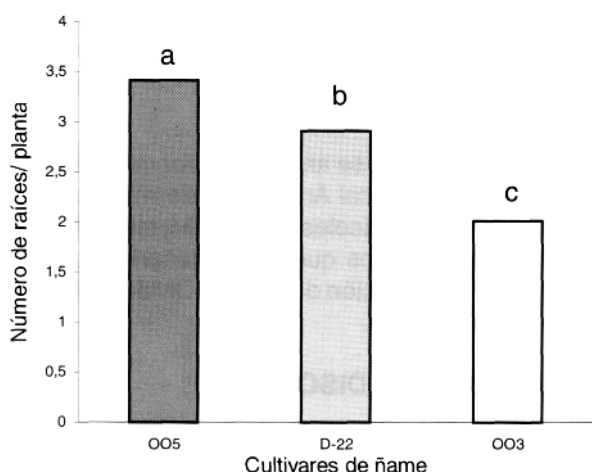


Figura 2. Número de raíces por planta de tres cultivares de ñame en condiciones *in vitro*.

El efecto del ANA indicó que, a medida que se aumentó la dosis, el número de raíces fue mayor hasta registrar 3.6 raíces por planta con dosis de 0.9 mg/l independientemente del cultivar (figura 3), aunque también se incrementó la formación de callo y la oxidación del medio de cultivo, en especial en los cultivares 003 y 005, lo cual indica que no es conveniente la adición de niveles más altos del regulador de crecimiento.

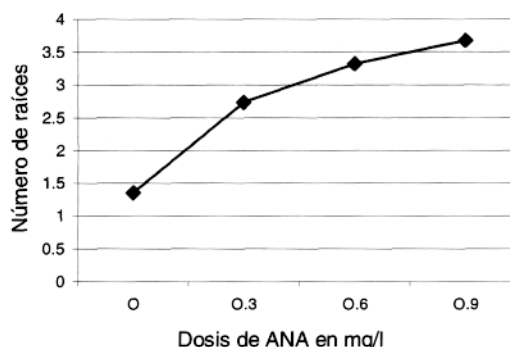


Figura 3. Efecto de cuatro niveles de ANA sobre el número de raíces por planta en plántulas de ñame en condiciones *in vitro*.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Puche y Rodríguez (1998), quienes no reportaron diferencias estadísticas entre las dosis de una auxina (IBA) y el testigo (medio sin hormona), en cuanto a producción de raíces por planta en el cultivar D-22.

Grosor de raíces

La figura 4 muestra que no se presentaron diferencias en el grosor de las raíces entre los cultivares. Se registraron valores en el rango de 1 a 2 mm, es decir, presentaron raíces semigruesas.

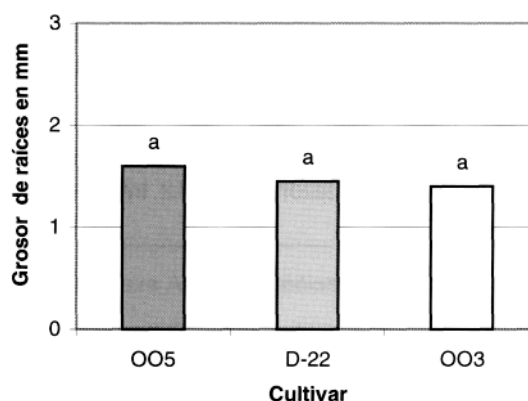


Figura 4. Grosor de raíces en mm de tres cultivares de ñame en condiciones *in vitro*.

En condiciones *in vitro*, raíces con estas características de grosor son aceptables, ya que se consideran raíces verdaderas. Aguas y colaboradores (2000), lograron aclimatar plántulas provenientes de sistemas *in vitro* de tres cultivares de ñame, las cuales presentaban raíces con diámetro de 2 a 3 mm.

El efecto de la auxina sobre el grosor de las raíces indicó que al aumentar la dosis se incrementó el grosor de las raíces. En la figura 5 se muestra que, con las dosis 0.9 mg/l de ANA, el grosor de las raíces registró significativamente mayores valores, independientemente de la accesión ($p < 0.05$).

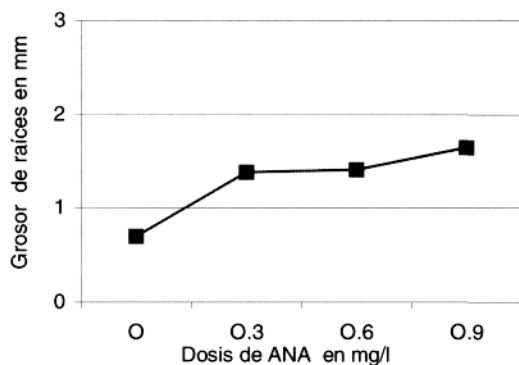


Figura 5. Efecto de cuatro niveles de ANA sobre el grosor de raíces en plántulas de ñame en condiciones *in vitro*.

Formación de callo

La figura 6 muestra el efecto de la dosis de auxina sobre la formación de callo en los tres cultivares de ñame. Al descomponer la interacción cultivar/dosis, los resultados indicaron que para el cultivar 005 la formación de callos se incrementó significativamente con las dosis de 0.6 y 0.9 mg/l de ANA.

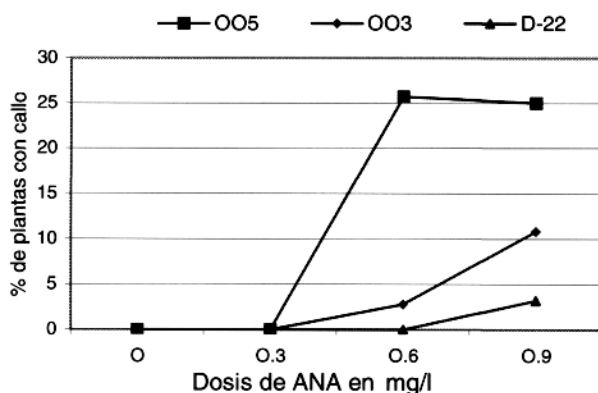


Figura 6. Efecto de cuatro dosis de auxina ANA sobre la formación de callo en tres cultivares de ñame en condiciones *in vitro*.

En 003 se registró un porcentaje de formación de callo del 10% con la dosis de 0.9 mg/l; en D-22, la formación de callos no fue importante con ninguna de las dosis evaluadas.

Litz y Jarret (1993) indicaron que la adición de auxinas al medio de cultivo promueve la formación de callo, pero en la etapa de enraizamiento es un factor que no debe presentarse, ya que por ser un tejido de consistencia musilaginosa, dificulta la manipulación de las plántulas en el momento del trasplante.

Además, se debe considerar que si este tejido no se remueve en el momento de la siembra al suelo, puede presentarse contaminación por hongos y bacterias. Por tal razón se debe tener en cuenta la dosis de auxina adicionada al medio de cultivo, con el propósito de minimizar esta expresión que si bien puede ser deseable para un programa de mejoramiento genético, también puede ser una limitante para la multiplicación masiva de vitroplantas.

Oxidación del medio de cultivo

La oxidación del medio de cultivo no fue influenciada por ninguno de los tratamientos. Se observó un rango de 0, en los tratamientos sin la hormona, a 2 en los tratamientos con las dosis más altas, lo cual no afectó el normal desarrollo de las vitroplantas.

CONCLUSIONES

Los tres cultivares de ñame presentaron diferente número de raíces de acuerdo con la dosis de auxina ANA adicionada al medio de cultivo.

Con las dosis de 0.6 y 0.9 mg/l se obtuvo un buen número de raíces por planta en los tres cultivares, aunque también se incrementó la formación de callo y la oxidación del medio de cultivo, en especial en los cultivares 003 y 005.

Las mejores dosis de auxina ANA para el enraizamiento *in vitro* de los tres cultivares de ñame fueron 0.3 mg/l para 005, 0.6 mg/l para 003 y de 0.9 mg/l para D-22.

La adición de estas dosis de ANA al medio de cultivo ha permitido obtener plántulas de los tres cultivares con buenas características de grosor y

número de raíces, las cuales han sido transferidas a casa malla a la fase de aclimatización, logrando un alto porcentaje de supervivencia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Gobierno de Holanda y a la Corporación PBA por la financiación de este trabajo a través del convenio con la Universidad de Córdoba y Corpoica, Regional 2.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguas, A.; Gamero G.; Romero, J.; y Espitia, A. 2000. Aclimatización de plantas *in vitro* de ñame espino, japonico y chocono en la Costa Caribe (Capítulo 8). En: *Ñame: Producción de semillas por Biotecnología*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos, pp. 104-112.
- Barba, A. 1991. Reguladores del crecimiento vegetal (Capítulo 4). En: *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Trillas, pp. 48 - 66.
- Hurtado, D. 1991. Adaptación de plantas obtenidas *in vitro* a condiciones naturales (Capítulo 13): En: *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Trillas, pp. 154-161.
- Krikorian, A. D. 1993. Propagación clonal *in vitro*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT, pp. 95 - 125.
- Litz, R. E.; Jarret, R. L. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT, pp. 143-172.
- López, C. E. 2003. Enraizamiento y aclimatización de plantas obtenidas *in vitro*. www.ciencias.uma.es/enraizamiento.html.
- Mantell, S. H.; Mague, S. Q.; Chandler F. L. 1993. Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT, pp. 481 - 494.
- Mroginski, L. A.; Roca, W. M. 1993. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT, pp. 19-40.
- Pelacho, A. A.; Glosas, L. M.; Cueva, R. B.; Sanfeliu, J. L.; Badia, J. S.; Alins G. V. 2003. Aplicaciones del cultivo *in vitro*. www.etsea2.udl.es/invitro
- Perea, M. D. 2000. Utilización de los sistemas *in vitro* para la obtención de plantas de ñame (*Dioscorea* spp.) libre de patógenos. En: *Ñame: producción de semillas por biotecnología*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos, pp. 41 - 53.
- Puche F. J.; Rodríguez, L. A. 1998. Estandarización de la metodología para la propagación *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata* L.) c.v Diamantes 22 vía segmentos nodales. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Córdoba.
- Quintero I. P; Jarra. A. O. 2000. Escala para medir niveles de oxidación en medios de cultivo. Documento interno de trabajo. Mimeografiado. Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Universidad de Córdoba.
- Ruscitti, M.; Marinucci, L.; Núñez, M.; Abedini, W.; Sharry, S. 2000. Enraizamiento *in vivo* e *in vitro* de *Pelargonium graveolens*. L'Herit. www.biotecnologiavegetal.ecampo.com
- Usui, K.; Okabe K.; Vítores, R.; Ramírez, A. 1996. Principios Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Guatemala: ICTA-JOCV, p. 165.
- Villalobos, V. M.; Torpe, T.A. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, M.; Mroginski, L. (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT, pp. 127-141.