

Micropropagación de ñame (*Dioscorea alata* P.).

I. Fase de establecimiento *in vitro**

** Gerardo DE LA CRUZ LICEA,
** Miriam LABRADA PONS
y ** MARGARITA GONZALEZ ROSELL

La desinfección del material vegetal y el control de la oxidación fenólica constituyen dos elementos esenciales para el establecimiento del cultivo *in vitro* con fines de micropropagación.

Generalmente la desinfección superficial de las plantas herbáceas se logra con mayor efectividad que en las plantas leñosas, no obstante la presencia de microorganismos sistémicos constituye un problema de la misma magnitud, no importa la especie de que se trate.

Teniendo en consideración que se han planteado algunas dificultades con la desinfección de los segmentos nodales de ñame (Cortes y Lii, 1983), el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar una metodología para el establecimiento de estacas nodales de ñame con un buen porcentaje de descontaminación.

Acondicionamiento de las plantas

El sustrato para la siembra de tubérculos, se compuso con una mezcla de tierra y materia orgánica (3 : 1), el mismo se colocó en bandejas metálicas con orificios de drenaje donde se desinfectó con solución de formol al 10%; y se mantuvo tapado durante 72 horas. El sustrato se lavó dos veces con agua estéril abundante y fue removido diariamente durante 2 semanas para eliminar cualquier residualidad del desinfectante.

Las bandejas fueron colocadas en 1 área exterior techada donde las plantas pudieran recibir la iluminación solar difusa en las horas de mayor intensidad luminosa.

La siembra se realizó según Mantell *et al.* 14 mm (\bar{X} = 10,5 mm; DE = 3,5; n = 24). de 120 g de peso aproximadamente, los cuales fueron lavados previamente con solución de detergente comercial al 1%, y enjuagados con agua destilada abundante. El riego se efectuó 3 veces semanalmente, y se mantenía una humedad adecuada.

En la tercera semana después de haber brotado las plantas fueron asperjadas de acuerdo según el procedimiento de Hu y Wang (1983), con una solución combinada de un antibiótico y un fungicida sistémico (0,1% de estreptomina más 0,1% de Benomil), a intervalos semanales durante 4 semanas consecutivas.

Desinfección superficial e inoculación los explantes

La inoculación *in vitro* comenzó una semana después de la primera aspersión (4ta

* Manuscrito, aprobado en septiembre de 1991.

** Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", Gaveta Postal 2360, Bayamo 85 100, Granma, Cuba.

semana de edad de las plantas). Los segmentos nodales se cortaron a un tamaño de 30 mm aproximadamente, se lavaron en solución de detergente comercial al 1% durante 5 min, después se enjuagaron con agua corriente abundante y finalmente con agua destilada.

La desinfección se realizó con Hipoclorito de calcio (cloro activo 2,5%) en vacío (3,2 - 9,2 kPa) durante 20 min.

Los segmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril en condiciones asépticas, se cortaron los extremos de los mismos hasta quedar reducidos a una longitud de 15 mm aproximadamente. Los segmentos nodales fueron inoculados en tubos de ensayos de 25 × 150 mm conteniendo 10 ml de medio de cultivo.

La composición del medio de establecimiento fue: sales macronutrientes D-567 (Mufinda *et al.* 1990), elementos micronutrientes de Dutcher y Powell (1972) (x 0,25), vitaminas de Murashige y Tucker (1969), hidrocloreuro de Cisteína 20 mg/1, peptona 1,0 g/1, sacarosa 0,146 M, y agar purificado 0,8%, el pH se ajustó a 5,8.

En cada desinfección se utilizó una muestra de 100 segmentos nodales.

A las 72 horas de inoculado cada experimento, se realizó la evaluación para determinar el porcentaje de explantas no contaminadas. Los segmentos nodales sobrevivientes fueron transferidos a frascos de 300 ml de capacidad con tapa metálica de rosca los que contenían 30 ml del medio basal sin peptona, se inoculaban de 3 a 4 segmentos por frasco. El proceso de acondicionamiento dio origen a plantas con crecimiento activo, lo cual coincide con lo planteado por Kartha *et al.* (1974) y Wang (1977).

Con la metodología descrita se logran buenos resultados en el establecimiento de segmentos nodales de ñame, con un porcentaje de descontaminación de 70-95% (Tabla 1).

TABLA 1. Resultados de la desinfección sistémica.

Tiempo transcurrido después de la aspersión (días)	Porcentaje de descontaminación %
Primera aplicación	
7	87
Segunda aplicación	
5	83
Tercera aplicación	
7	79
15	87
Cuarta aplicación	
6	95
6	92
36	74
37	71
40	85
50	70
55	79
62	88
68	88
77	91

Las diferencias en los resultados de la desinfección en los diferentes experimentos no se debe a la ineffectividad del acondicionamiento de las plantas o a una reinfección irregular por microorganismos sistémicos, sino al error técnico en cada experimento al realizar la desinfección superficial, por lo que la contaminación aguda resulta diferente en cada uno de ellos.

La aplicación de los desinfectantes sistémicos debe hacerse con un aerosol fino para evitar las concentraciones de líquido sobre la superficie foliar, en las zonas de las hojas donde hubo un goteo grueso se observó la decoloración y posterior necrosis de las mismas. Esto es debido a que la Estreptomycin causa anomalías físicas en los cloroplastos y mitocondrias (Flick, 1983). Por esta razón sólo se utilizó una solución de Benomil (0,1%) en la tercera y cuarta aplicación, aún cuando las plantas no resultaron afectadas en su vigor y crecimiento activo.

El uso de la Peptona en el medio de establecimiento fue con el objetivo de lograr una mejor discriminación de los segmentos contaminados y disminuir el riesgo de una contaminación crónica en la micropropagación a gran escala, no obstante su uso debe restringirse solamente a las primeras 72 horas de cultivo, pues un período de tiempo superior retarda el desarrollo de las yemas axilares.

Se controló la oxidación fenólica con el uso de la cisteína, aunque ocasionalmente se presentó con una ligera intensidad, y no afectó la supervivencia y el desarrollo de los segmentos nodales.

Se observó la formación de vástagos y raíces adventicias en el medio de establecimiento, lo cual coincide con lo expuesto por Martín y Delpin (1969), Mantell *et al.* (1978), Cortes y Lii (1983). El mejor crecimiento de los vástagos se obtuvo en los segmentos nodales que presentaron raíces más largas y vigorosas, mientras que aquellos que no presentaron raíces o éstas estaban poco desarrolladas tuvieron un crecimiento pobre o nulo. Cruz, *et al.* (1989) plantearon que en las plántulas de papa creciendo *in vitro* se obtiene un buen desarrollo del caule cuando existe un buen enraizamiento, de lo contrario el desarrollo es limitado.

Según Hu y Wang (1983) algunas especies pueden ser establecidas sin citoquininas por existir hormona endógena ya presente en los explantes, además de que algunas plantas como por ejemplo *Solanum* sp. regeneran fácilmente raíces adventicias, y las raíces regeneradas pueden actuar como una nueva fuente de citoquininas antes que la hormona residual esté agotada.

Cortes y Lii (1983) plantearon que los segmentos nodales de plantas menores de dos meses de edad de la especie *D. rotundata* eran inmaduras y no desarrollaban plantas en muchos casos. En el presente trabajo se emplearon segmentos de *D. alata* de plantas de cuatro semanas de edad; se llegó a lograr el desarrollo adecuado de los mismos.

Estos mismos autores además observaron diversos patrones de desarrollo en los vástagos de *D. rotundata*, unos multifoliales y otros que regeneran en plántulas con 2-4 segmentos nodales. Mantell *et al.* (1978) también plantearon la obtención de plántulas multiramificadas en *D. alata* y *D. rotundata*.

La metodología expuesta resulta adecuada para el establecimiento de segmentos nodales de flanes libres de contaminantes sistémicos (bacterias y hongos).

REFERENCIAS

- Conger, B. V. (1978): *Cloning Agricultural plants via in vitro techniques*. C. R. C. Press, Florida, 139 pp.
- Cortes Monllor, A., y L. Lii Jang (1983): Tissue culture propagation of yam in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P. R.*, 67(4):419-428.
- Cruz, G. de la, Z. Infante, y L. Lago (1989): Efecto de diferentes medios nutritivos en la propagación de papa *in vitro*. *Cien. Agricul.*, 37-38:178-179.
- Dutcher, R. D. y L. E. Powell (1972): Culture of apple shoots from buds *in vitro*. *J. Ame. Soc. Hortic Sci.*, 97:511.
- Flick, C. E. (1983): Isolation of mutants from cell culture. En *Handbook of plant cell cultures*. (D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, y Y. Yamada, eds.), Mac Millan, New York, vol. 1, pp. 393-441.
- Hu, C. Y., y P. J. Wang (1983): Meristem, shoot tip, and bud cultures. En *Handbook of plant cell cultures* (D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, y Y. Yamada, eds.), Mac Millan New York, vol. 1, pp. 177-227.
- Kartha, K. K., F. Constabel, y J. P. Shyluk (1974): Regeneration of *Cassava* plants from apical meristems. *Plant Sci. Lett.* 2:107-113 [citado por Hu y Wang, 1983].

- Mantell, S. H., S. O. Haque, y A. P. Whitehall (1978): Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* Poir. yams by Tissue culture. *J. Hortic. Sci.*, 53(2): 95-98.
- Martin, F. W y H. Delpin (1969): Techniques and problems in the propagation of sapogenin bearing yams from stem cuttings. *J. Agric. Univ. P. R.*, 53:191-198 [citado por Cortes y Lii, 1983].
- Mufinda, E., G. de la Cruz, y V. Orozco (1990): "Optimización de medios de cultivo para crecimiento *in vitro* de embriones de *Coffea canephora* cv. Robusta" [inédito], tesis de diploma, Facultad de Ciencia Agrícola, Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de Bayamo, Bayamo.
- Murashige, T., y D. P. H. Tucker (1969): *Growth factor requirements of citrus tissue culture*. Proc. Ist. Int. Citrus Symp., 3, 1155. [citado por Conger, 1978].
- Wang, P. J. (1977): Regeneration of virus-free potato from tissue culture. En *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (W. Barz, E. Reinhard, y M. H. Zenk, eds.) Springer-Verlag, Berlin y Heidelberg, pp. 386-391. [citado por Hu y Wang, 1983].