

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
MICROPROPAGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN MASIVA DE  
PLANTAS DE ÑAME ESPINO (*D. rotundata*) MEDIANTE EL  
CULTIVO IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES.**

**ROBERTO CARLOS ACOSTA PINEDA**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SINCELEJO  
2000**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
MICROPROPAGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN MASIVA DE  
PLANTAS DE ÑAME ESPINO (*D. rotundata*) MEDIANTE EL  
CULTIVO IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES.**

**ROBERTO CARLOS ACOSTA PINEDA**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de Biólogo con énfasis  
en Biotecnología.**

**Asesor**

**JAVIER DARIO BELTRÁN HERRERA**

**Ph.D Fitopatología.**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SINCELEJO  
2000**

“Concédame Dios hablar como él quiere  
y concebir pensamientos dignos de sus dones,  
por que él es quien guía la sabiduría y quien dirige mis labios;  
que nosotros y nuestras palabras en sus manos estamos  
con toda nuestra prudencia y destreza en el obrar.  
Fue él quien me concedió un conocimiento verdadero de los seres,  
para conocer la estructura del mundo y las actividades de los elementos,  
el principio, el fin y el medio de los tiempos.”

Sabiduría, Cap. 7, ver. 15-18.

Nota de aceptación

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Sincelejo, junio de 2001.

## DEDICATORIA

A Dios, por ser la fuente de mi inspiración y sabiduría.

A mis padres José y Silvia, por su apoyo incondicional.

A mis hermanos, Ismael, Wilson, Ronald y Mary, por su colaboración.

A mi esposa Carmen Julia, por su apoyo y comprensión.

A mi tía Ena, por tenerme siempre presente en sus oraciones.

A los docentes Adolfo Consuegra, Rubén Patiño y Octavio Arzuza, por contribuir con el éxito de mi carrera.

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos:

A la UNIVERSIDAD DE SUCRE, por su apoyo técnico.

A JAVIER DARÍO BELTRÁN, Ph.D Fitopatología, por su asesoría en el trabajo de grado.

A REINALDO TRUJILLO SÁNCHEZ, Ph.D Ciencias Biológicas, por sus enseñanzas.

AI PROGRAMA DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE ÑAME LIBRE DE PATÓGENOS, por su apoyo financiero.

A todas aquellas personas que en una u otra forma colaboraron en la realización del presente trabajo.

## RESUMEN

Para la micropropagación de ñame espino (*D. rotundata*) se utilizaron plantas madre de 2 a 3 meses de edad de las cuales se tomaron los explantes (segmentos nodales). Estos fueron sometidos inicialmente a diferentes tratamientos de desinfección resultando eficiente la aplicación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 2% por 45 segundos, etanol 70% por 45 segundos e hipoclorito de sodio (NaOCl) 1% por 20 minutos con enjuagues intermedios de agua destilada.

Los explantes cortados longitudinalmente fueron sembrados en medio de cultivo Murashige y Skoog "MS" (1962) con adición de 30 gr/l de sacarosa, 6,5 gr/l de agar y diferentes combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP por separado en concentraciones de 0,1 mg/l y 0,3 mg/l respectivamente, siendo la combinación ANA-BAP eficiente para el establecimiento de explantes y la formación de múltiples brotes, y la combinación ANA-KIN para la inducción de nudos y la maduración de las plántulas.

La vigorosidad de los brotes disminuyó después de 5 ciclos de subcultivo bajo la acción de la combinación ANA-KIN y se mantuvo constante durante 10 ciclos de subcultivo bajo la acción de la combinación ANA-BAP. El enraizamiento de las plantas se logró con la adición al medio de cultivo de ANA en concentración de 0,2 mg/l y una reducción de sales al 50% y de sacarosa al 1.5% con un fotoperíodo de 8 horas luz y 16 de oscuridad.

La humedad relativa del interior de los recipientes de cultivo fue controlada mediante la utilización de un sistema de sellado consistente en papel aluminio perforado cubierto con una película plástica semipermeable (PPA), lo cual facilitó la aclimatación de las plantas en invernadero y campo, alcanzándose un 97% promedio de supervivencia.

## INTRODUCCIÓN

El ñame es una planta perteneciente al género *Dioscorea*, comprende alrededor de 600 especies de las cuales las más importantes para el consumo humano son: *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. bulbífera*, *D. esculenta*, *D. trifida* y *D. dumetorium*. (Ammirato, 1980).

Las especies *D. alata* y *D. rotundata*, son las más cultivadas en el mundo. La primera comprende variedades como ñame Palomero, Osito, Coco, Coco colonero, Caimán, Caimán colonero, Concha de coco y Alemán. De la especie *D. rotundata*, se conocen las variedades Espino, Espino guinea y Chingola. El término “colonero” se usa para nombrar los ñames con pulpa morada. (Acosta, 1980).

En Colombia el ñame se cultiva en los departamentos de Sucre, Córdoba, Bolívar, Magdalena, Atlántico y Chocó, siendo los tres primeros los mayores productores. Como zonas potenciales se pueden distinguir los Llanos Orientales, el Valle del Cauca, Urabá, y Antioquia. Su importancia radica en



la utilización de sus tubérculos como fuente de carbohidratos o de compuestos medicinales del grupo de los esteroides. (Acosta, 1980).

En la actualidad, la mayor proporción del área sembrada con ñame en la región Caribe carece de tecnología, aplicándose solo los métodos tradicionales con una productividad mínima. Además, se ha considerado que uno de los factores que más limitan la producción de ñame en Colombia son las enfermedades, que se presentan tanto en el campo como durante el almacenamiento. Dentro de éstas las más severas son la antracnosis y la marchitez ocasionada por los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxisporum* respectivamente. (Osorio y Ramírez, 1989).

En el departamento de Sucre el cultivo del ñame ha disminuido a niveles críticos, en la década de 1980 el promedio del área sembrada con ñame llegó a 5.185 ha, mientras que en 1997 solamente alcanzó las 2.779 ha. La susceptibilidad de algunas especies a la antracnosis y la marchitez ha sido la causa más relevante de la baja productividad en el cultivo. La aparición de la antracnosis ha ocasionado pérdidas por más del 50% en algunas zonas del

departamento, lo cual ha desmotivado mucho a los agricultores para seguir cultivando este producto. (Banquez,1998).

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de micropropagación para la obtención masiva de plantas de ñame espino (*D. rotundata*) libre de patógenos, como alternativa de solución para proporcionar al agricultor semillas sanas de buena calidad que aseguren en parte una alta productividad del tubérculo y aminoren los costos de mantenimiento del cultivo. Para lo cual se utilizaron plantas madre de las que se extrajeron los explantes (segmentos nodales); se evaluaron diferentes concentraciones de NaOCl para su desinfección, y diferentes combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP para favorecer el crecimiento, la multiplicación y el enraizamiento de los brotes, así como también tres sistemas de sellado para controlar la humedad relativa del interior del recipiente de cultivo.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL.

Estandarizar la técnica de micropropagación para la multiplicación masiva de plantas de ñame Espino (*D. rotundata*).

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Obtener plantas madre de ñame espino (*D. rotundata*) a partir del cultivo tradicional de segmentos de tubérculos.
- Seleccionar los explantes (segmentos nodales) más adecuados para la micropropagación de plantas ñame espino (*D. rotundata*).
- Determinar la concentración de NaOCl más eficiente en la desinfección de explantes.

- Evaluar la influencia de diferentes combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP en el establecimiento y multiplicación de brotes de ñame espino (*D. rotundata*).
- Determinar la concentración ideal de ANA que favorezca el enraizamiento de las plántulas de ñame espino (*D. rotundata*).
- Evaluar el efecto del sistema de sellado sobre la humedad relativa del interior del recipiente de cultivo y su influencia en el crecimiento de las plántulas in vitro de ñame espino (*D. rotundata*).

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS.

Durante los años de 1878 y 1893, varios científicos hicieron observaciones sobre fragmentos de tejidos aislados de plantas. Vocting en 1878, Rechinger en 1893 y Haberland en 1902, citados por Doods y Roberts (1984), reaizaron investigaciones sobre la histogénesis, la formación de callo y el cultivo de células en un medio nutritivo respectivamente.

En 1904 Hanning, citado por Pierik (1990), desarrolló un nuevo método de cultivo **in vitro** de plantas al que llamó cultivo de embriones. Aisló embriones inmaduros de algunas crucíferas, obteniendo plantas viables. Nuevos tipos de cultivo se hicieron populares desde la fecha, como la siembra **in vitro** de semillas de orquídea, el cultivo de callos, el cultivo de órganos y otros tejidos. Después de 1945 todos estos tipos de cultivo se agruparon bajo el nombre de **Cultivo de Tejidos de plantas**.

En 1934 White, citado por Hartman y Kester (1992), pudo cultivar raíces de tomate continuamente in vitro, proporcionándoles extracto de levadura; los ingredientes esenciales resultaron ser algunas vitaminas del complejo B, en especial la B<sub>1</sub> (tiamina). El descubrimiento de las citokininas y del control hormonal estableció las bases para manipular la iniciación de algunos órganos y proporcionó el principio en que se basa toda micropropagación.

## **2.2 BASES FISIOLÓGICAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS.**

El concepto de que las células individuales son totipotenciales está escrito en la teoría celular. En 1839 Schwan, citado por Doods y Roberts (1984), expresó que cada célula viviente de un organismo multicelular debería ser capaz de desarrollarse independientemente bajo condiciones ambientales óptimas.

Para propiciar el crecimiento de las células es necesario cultivarlas en un medio nutritivo que contenga sales minerales, una fuente de carbono y hormonas vegetales que regulen su crecimiento. Dentro de las hormonas y

reguladores de crecimiento las más importantes son las auxinas, las citokininas y, en algunos casos las giberelinas. Las auxinas inducen dominancia apical y favorecen el enraizamiento; las citokininas estimulan la formación de brotes axilares y adventicios y las giberelinas se usan para inducir alargamiento de tallo y formación de raíces. Entre las auxinas están: el ácido Naftalenacético (ANA), el ácido Indolbutírico (AIB); el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido Indolacético (AIA). En el grupo de las citokininas se encuentran la 6-Bencilaminopurina (BAP); la Kinetina (KIN); la Zeatina y la 6-isopentiladenina (2ip). (Hartmann y Kester, 1992).

### 2.3 ESTUDIO SOBRE EL CONTROL AMBIENTAL IN VITRO

Iwanami, Kozai, Kitaya & Kino (1992), demostraron que la elongación de los tallos de las plantas **in vitro** es afectada por varios factores tales como la calidad de la luz, la temperatura, la humedad y los reguladores de crecimiento exógenos. De igual manera, afirman que la calidad de la luz se puede mejorar utilizando como suplemento de la luz blanca, la luz roja, la cual ha demostrado ser muy eficiente en el crecimiento de los explantes.

Los factores ambientales como la concentración de gas carbónico (CO<sub>2</sub>) y el intercambio gaseoso entre los recipientes de cultivo y el medio externo, cumplen un papel importante en el incremento de la tasa fotosintética de las vitroplantas favoreciendo el fotoautotrofismo. (Kozai & Fujiwara, 1992).

La humedad relativa (HR) afecta de manera directa y proporcional la elongación de los tallos de las vitroplantas. Estudios hechos en papa (*Solanum tuberosum*) demostraron que la elongación de las plantas decrecía cuando disminuía la HR inicial. (Kozai, Fujiwara, Tanaka, Watanabe & Kira (1992).

El volumen de la solución del medio de cultivo es un factor que afecta los cambios en la concentración de los componentes del medio y el crecimiento de las vitroplantas. Murai, Kubota & Kozai (1992) encontraron que existía una relación lineal entre el peso de la planta y la cantidad de iones absorbidos por ella. Para volúmenes pequeños de medio la concentración de iones decrecía más rápidamente que para volúmenes relativamente grandes de medio.



Los recipientes de cultivo necesitan, por un lado ser cerrados, para impedir la deshidratación y la infección del medio de cultivo, pero por otro lado tiene que ser posible el intercambio gaseoso con el exterior para evitar una falta de oxígeno, o el exceso de gases producidos, como el dióxido de carbono y el etileno. Por ello cada tipo de cierre es un equilibrio entre estas necesidades. De Proft en 1986, citado por Pierik (1990), demostró que en recipientes sellados herméticamente, las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y etileno son muy elevadas, y en consecuencia se reduce el crecimiento del material vegetal y se producen plantas cloróticas.

## 2.4 PROPAGACIÓN IN VITRO DE ÑAME

El cultivo **in vitro** de ñame depende del crecimiento consistente del brote formado a partir de un segmento nodal. Mantell (1979), encontró que después de estandarizar la técnica de segmentos nodales se puede obtener hasta 65.000 nuevas plántulas a partir de un segmento nodal cultivado por un período de seis meses.

La erradicación de infecciones virales pudo ser posible mediante cultivo **in vitro** de puntas meristemáticas. Estudios hechos en ñame blanco (*D. alata*) demostraron que el pretratamiento de las plantas madres sometidas a temperaturas de 36°C durante 14 días y el posterior cultivo de puntas meristemáticas reducía la presencia de virus en las plántulas. (Mantell, 1980).

En Puerto Rico, se estableció un método rápido de propagación **in vitro** de ñame *D.rotundata* c.v Habanero mediante el cultivo de segmentos nodales en medio nutritivo Murashige y Skoog (MS) (1962), modificado con la adición de ácido indol-acético (AIA) y kinetina (KIN) como medio de establecimiento y ácido naftalen-acético (ANA) como medio de enraizamiento. El ciclo de propagación duró aproximadamente 3 meses incrementándose la producción de plantas de ñame 4 veces. (Cortés & Lii-Lang, 1983).

Cultivos de suspensiones celulares embriogénicas de ñame Chino (*D. opposita*), fueron desarrollado a partir de callos obtenidos de segmentos de tallo cultivados sobre agar en medio MS modificado con 2,4-

Diclorofenoxiacético (2,4-D). Después de 30 días se transfirieron los callos a MS sin hormonas para el desarrollo de embriones. Los embriones globulares se formaron 4 semanas después de la adición de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) desarrollándose y germinando normalmente. (Nagasawa, 1988).

Shou (1988), demostró que la inducción de microtubérculos de ñame Blanco *D. rotundata* a partir de segmentos nodales fue posible sobre un medio MS suplementado con varias concentraciones de sacarosa, L-cisteína, kinetina y agar. La frecuencia de tuberización fue óptima en un foto período de 12 y 16 horas luz dependiendo de la concentración de sacarosa. Los tubérculos obtenidos fueron plantados en sustratos especiales hasta la germinación.

Dos tipos de ñame del oeste de África, *D. abyssinica* y *D. mangelotiana* fueron micropropagados a partir de cultivo de segmentos nodales. Ambas especies produjeron 4-5 nudos por cada segmento cultivado. La talla de los segmentos regenerados fue de 0,5 cm como resultado de la micropropagación. El número de nudos producido fue constante después de

5 ciclos de subcultivo. Sin embargo, *D. abyssinica* disminuyó la eficiencia de propagación, al incrementarse el número de subcultivos. (Lauzer, 1991).

Murashige & Skoog, 1962, citados por Roca y Mroginski (1991), diseñaron un medio de cultivo consistente en una mezcla de sales inorgánicas esenciales para el crecimiento de las plantas. Este medio conocido como “MS”, resultó eficiente para la propagación *in vitro* de ñame. Para el cultivo especial de meristemas, el medio se complementa con 1,0 mg/l de ANA y 0,2 mg/l de BAP con adición de agar en concentración de 8 gr/l. Si no se adicionan estas hormonas, los explantes se decoloran y al poco tiempo mueren.

Explantes tomados de hojas de *D. bulbífera* en diferentes estados de desarrollo fueron cultivados *in vitro* para la proliferación de callos usando diferentes concentraciones y/o combinaciones de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-Bencilaminopurina (6-BAP). Wernicke (1993), observó que la adición de 6-BAP no fue necesaria para la producción de callos en explantes de hojas jóvenes, pero resultó indispensable para los explantes de hojas más

desarrolladas. El grado de 6-BAP aumentaba con la edad de la hoja. (Wernicke, 1993).

Malaurie (1995), demostró que las concentraciones de reguladores de crecimiento sobre el desarrollo morfológico de puntas meristemáticas en *D. cayenensis*, *D. rotundata* y *D. prachensilis* afectaba el desarrollo de raíces cuando se utilizaban concentraciones altas de ANA/6-BAP. Además, se aumentaba el desarrollo de callos.

Estudios realizados por Twyford y Mantell (1996) sobre la producción de embriones somáticos y plantas a partir de callos de células de raíz de *D. alata* cv Lisbon, demostraron que la maduración de los embriones se vio afectada por el incremento de la densidad de las células y los niveles de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) presentes en el medio. La maduración óptima de los embriones se observó cuando la densidad de las células embriogénicas disminuyó y los niveles de GA<sub>3</sub> se ajustaron a concentraciones de 1.5 mg/litro.

Perea (1998), evaluó el efecto del Thiadizurón (TDZ) y el 6-BAP en la formación de brotes a partir del cultivo de segmentos nodales en medio líquido, posteriormente subcultivándolos en medio sólido básico enriquecido. Observó además, el aumento de formación de brotes axilares en número de 3 a 5, luego de 18 semanas. La capacidad de proliferación de brotes de segmentos nodales fue observada en medio líquido a las 4 semanas arrojando como resultado importante el aumento en la velocidad de propagación de las plantas de *D. alata* cv Coco alemán , *D. rotundata* cv Espino y *D. japónica* de 3 a 5 veces.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRE.

Se seleccionaron tubérculos sanos de *D. rotundata* cv Espino, se cortaron trozos de aproximadamente 100 gr y se sometieron a desinfección con fungicida por 20 minutos, figura 1. Posteriormente se secaron a temperatura ambiente y sembraron en sustrato estéril preparado con una parte de arena, una de suelo y una de aserrín. Germinadas las plantas se fertilizaron con MS cada 3 días con un riego intermedio de agua potable. La poda de los ápices se realizó cada 15 días y sólo después que la planta alcanzó los 2 mt de altura.

Las plantas se llevaron a condiciones de invernadero, para su crecimiento, figura 2, a una temperatura entre 30° y 35°C y una humedad relativa oscilante entre 70% y 75%, con una intensidad lumínica promedio de 75  $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### 3.2 VARIABLES E INDICADORES.

#### Selección de explantes.

Para seleccionar los explantes (segmentos nodales) se tomó como variable la ubicación del explante en la planta madre (tercio superior, tercio medio y tercio inferior), figura 3, y como indicadores la respuesta a la desinfección y el tiempo de germinación. La respuesta a la desinfección fue evaluada en términos de sano y lesionado, y el tiempo de germinación fue medido en días.

#### Desinfección de explantes.

**Cuadro 1.** Variables e indicadores utilizados para evaluar el efecto del NaOCl en la desinfección de explantes de ñame espino (*D. rotundata*).

<b>Variables</b>	<b>Indicadores</b>
Concentraciones de NaOCl % v/v	N° explantes descontaminados
	N° explantes contaminados con hongos
Tiempo (minutos)	N° explantes contaminados con bacterias
	N° explantes contaminados con levaduras



## Establecimiento de explantes.

**Cuadro 2.** Variables e indicadores utilizados para evaluar el efecto del tipo de corte del explante en la germinación de brotes.

<b>Variables</b>	<b>Indicadores</b>
Explantes enteros	Número de brotes por explante
Explantes escindidos longitudinalmente	Tiempo de germinación del brote (días)

**Cuadro 3.** Variables e indicadores utilizados para evaluar el efecto de las combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP en el establecimiento de explantes de ñame espino (*D. rotundata*).

<b>Variables</b>	<b>Indicadores</b>
Concentración ANA-KIN	Número de explantes germinados
Concentración ANA-BAP	

## Multiplicación de explantes.

**Cuadro 4.** Variables e indicadores utilizados para evaluar la masa crítica de los segmentos nodales de ñame espino (*D. rotundata*) en la multiplicación.

<b>Variables</b>	<b>Indicadores</b>
Tamaño del segmento nodal	Tiempo de germinación del brote (días)
	Número de hojas por brote

**Cuadro 5.** Variables e indicadores utilizados para evaluar el efecto de las combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP en la multiplicación de plántulas de ñame espino (*D. rotundata*).

<b>Variables</b>	<b>Indicadore</b>
Concentraciones ANA-KIN	Número de nudos por brote
Concentraciones ANA-BAP	Número de brotes por nudo

**Cuadro 6.** Variables e indicadores utilizados para evaluar la frecuencia de subcultivos en la multiplicación de plántulas de ñame espino (*D. rotundata*).

<b>Variables</b>	<b>Indicadores</b>
Combinación ANA-KIN	Número de plantas por ciclo de subcultivo
Combinación ANA-BAP	

### **Enraizamiento de plántulas.**

**Cuadro 7.** Variables e indicadores utilizados para evaluar el efecto del ANA en el enraizamiento de plántulas de ñame espino (*D. rotundata*).

<b>Variables</b>	<b>Indicadores</b>
Concentración de ANA mg/l	Número de plantas enraizadas
	Número de raíces por planta

## Sellado de los recipientes de cultivo.

**Cuadro 8.** Variables e indicadores utilizados para evaluar el efecto del sellado sobre la humedad relativa del interior del recipiente de cultivo y su influencia en el crecimiento de las plántulas de ñame espino (*D. rotundata*).

<b>Variables</b>	<b>Indicadores</b>
Sello con papel aluminio + PPA	Presencia de vitrificación en plántulas
Sello con PPA	Presencia de marchites en plántulas
Sello con papel aluminio perforado + PPA	Disminución del volumen del medio de cultivo

### 3.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para la selección de explantes se dividió la planta en tres regiones de las cuales se tomaron 10 segmentos nodales por cada tercio para un total de 3 tratamientos con 10 repeticiones. Los datos se recolectaron después de 10 días, anexo 1.

En la etapa de desinfección de explantes se evaluó una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y etanol por 45 segundos y 2 concentraciones de NaOCl con 2 tiempos de inmersión, para un total de 4 tratamientos, cuadro 9, con 40 repeticiones dispuestas en 10 bloques con 4 réplicas. Para este caso se utilizó un diseño de bloques al azar. Los datos fueron tomados después de 10 días, anexos 2-3.

**Cuadro 9.** Secuencia de aplicación de los diferentes tratamientos utilizados en la desinfección de explantes de ñame espino (*D. rotundata*).

Peróxido de hidrógeno 2%	Etanol 70%	Hipoclorito de sodio (NaOCL)	Tiempo (Minutos)
45 segundos	45 segundos		10
		1%	20
			10
		2%	20

Para determinar el efecto del tipo de corte en los explantes sobre la formación de brotes se evaluaron 2 cortes con 10 repeticiones por cada uno. Los datos fueron recolectados después de 10 días de observación, figura 4, anexo 4.

En las etapas de establecimiento y multiplicación de explantes se evaluó una concentración de sales MS y de sacarosa con 11 concentraciones de las combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP respectivamente y un patrón sin hormonas para cada una, para un total de 12 tratamientos por cada combinación hormonal, cuadros 10 y 11, con 40 repeticiones por tratamiento, dispuestas en 10 bloques con 4 réplicas utilizándose un diseño de bloques al azar, anexo 5. Los datos fueron tomados después de 10 días en etapa de establecimiento y 30 días en etapa de multiplicación, anexo 6.

Para determinar la masa crítica en los subcultivos se evaluaron tres tamaños en los explantes, tomando 10 segmentos nodales por cada uno de ellos para un total de 3 tratamientos con 10 repeticiones. Los datos fueron recolectados después de 20 días, anexo 7.

En la determinación de la frecuencia de subcultivos se evaluaron dos tratamientos hormonales (ANA-KIN y ANA-BAP) con 10 repeticiones por tratamiento. Los datos se recolectaron cada 30 días durante 10 ciclos de subcultivo, anexo 8.

**Cuadro 10.** Secuencia utilizada para la aplicación de los diferentes tratamientos de la combinación hormonal ANA-KIN en las etapas de establecimiento y multiplicación de plántulas de ñame espino (*D. rotundata*).

Sales MS	Tratamientos hormonales		Sacarosa
100%	T1	Sin hormonas	3%
	T2	ANA 0,0 mg/l-KIN 0,1mg/l	
	T3	ANA 0,0 mg/l-KIN 0,2 mg/l	
	T4	ANA 0,0 mg/l-KIN 0,3 mg/l	
	T5	ANA 0,1 mg/l-KIN 0,0 mg/l	
	T6	ANA 0,1 mg/l-KIN 0,1 mg/l	
	T7	ANA 0,1 mg/l-KIN 0,2 mg/l	
	T8	ANA 0,1 mg/l-KIN 0,3 mg/l	
	T9	ANA 0,2 mg/l-KIN 0,0 mg/l	
	T10	ANA 0,2 mg/l-KIN 0,1 mg/l	
	T11	ANA 0,2 mg/l-KIN 0,2 mg/l	
	T12	ANA 0,2 mg/l-KIN 0,3 mg/l	

T= tratamiento.

**Cuadro 11.** Secuencia utilizada para la aplicación de los diferentes tratamientos de la combinación hormonal ANA-BAP en las etapas de establecimiento y multiplicación de plántulas de ñame espino (*D. rotundata*).

Sales Ms	Tratamientos hormonales		Sacarosa
100%	T1	Sin hormonas	3%
	T2	ANA 0,0 mg/l-BAP 0,1 mg/l	
	T3	ANA 0,0 mg/l-BAP 0,2 mg/l	
	T4	ANA 0,0 mg/l-BAP 0,3 mg/l	
	T5	ANA 0,1 mg/l-BAP 0,0 mg/l	
	T6	ANA 0,1 mg/l-BAP 0,1 mg/l	
	T7	ANA 0,1 mg/l-BAP 0,2 mg/l	
	T8	ANA 0,1 mg/l-BAP 0,3 mg/l	
	T9	ANA 0,2 mg/l-BAP 0,0 mg/l	
	T10	ANA 0,2 mg/l-BAP 0,1 mg/l	
	T11	ANA 0,2 mg/l-BAP 0,2 mg/l	
	T12	ANA 0,2 mg/l-BAP 0,3 mg/l	

T= tratamiento.

Para el enraizamiento de plántulas se evaluó una concentración de sales MS y sacarosa con tres concentraciones de ANA y un patrón sin hormonas, para un total de 4 tratamientos, cuadro 12, con 40 repeticiones dispuestas en 10 bloques con 4 réplicas mediante un sistema de bloques al azar, anexo 9. Los datos fueron recolectados después de 30 días, anexo 10.

**Cuadro 12.** Secuencia utilizada para la aplicación de los diferentes tratamientos con ANA en el enraizamiento de plántulas de ñame espino (*D. rotundata*).

Sales Ms	Tratamientos hormonales		Sacarosa
50%	T1	ANA 0.0 mg/l	1.5%
	T2	ANA 0.1 mg/l	
	T3	ANA 0.2 mg/l	
	T4	ANA 0.3 mg/l	

T= tratamiento.

Para determinar la influencia del sellado sobre el crecimiento de las plantas y la humedad relativa del interior del recipiente de cultivo, se utilizaron tres sistemas con 10 repeticiones por cada uno. Los datos fueron tomados después de 30 días, anexo 11.

Las plantas in vitro se incubaron en estantes especiales iluminados con lámparas fluorescentes de 25 vatios con una luminosidad promedio de  $71 \text{ umol. m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$ , una temperatura promedio de  $29^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa oscilante entre 35% y 45%, figura 5.

Las plántulas obtenidas se transfirieron a condiciones de invernadero con una intensidad lumínica promedio de  $81 \text{ umol. m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$ , y una humedad relativa promedio de 75%. El sustrato fue preparado con cascarilla de arroz, arena y tierra negra desinfectadas con formol al 2% durante 3 días.

Inicialmente las planta fueron cubiertas con frascos de vidrio durante dos semanas y posteriormente expuestas a la intemperie. Los resultados se anotaron teniendo en cuenta el porcentaje de plantas sobrevivientes y el sistema de sellado de los recipientes de cultivo en etapa in vitro después de 20 días, anexo 11



## 4. RESULTADOS

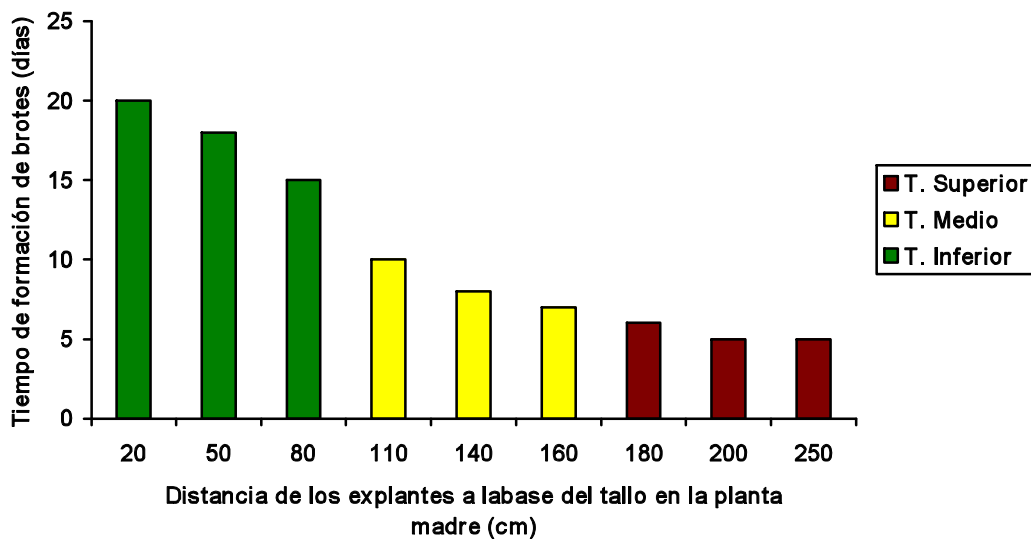
### 4.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRE.

La obtención de plantas madre de ñame espino (*D. rotundata*) fue posible 20 días después de la siembra de la semilla, figura 6. La poda periódica de los ápices permitió obtener un número mayor de segmentos nodales, un promedio de 43 explantes por planta en un periodo de 3 meses de cultivo, figura 7.

### 4.2 SELECCIÓN DE EXPLANTES.

Se observó que los explantes situados en el tercio inferior de la planta no sufrieron lesiones en sus tejidos después de la desinfección con NaOCl pero tardaron 17 días en promedio para germinar, mientras que los explantes situados en el tercio medio de la planta germinaron en un promedio de 8 días y tampoco sufrieron lesiones en sus tejidos después de la desinfección. Los

explantes situados en el tercio superior de la planta sufrieron lesiones en sus tejidos a causa de la desinfección y poco tiempo después necrosaron, pero los que lograron resistir la desinfección germinaron en un promedio de 6 días, figura 8.

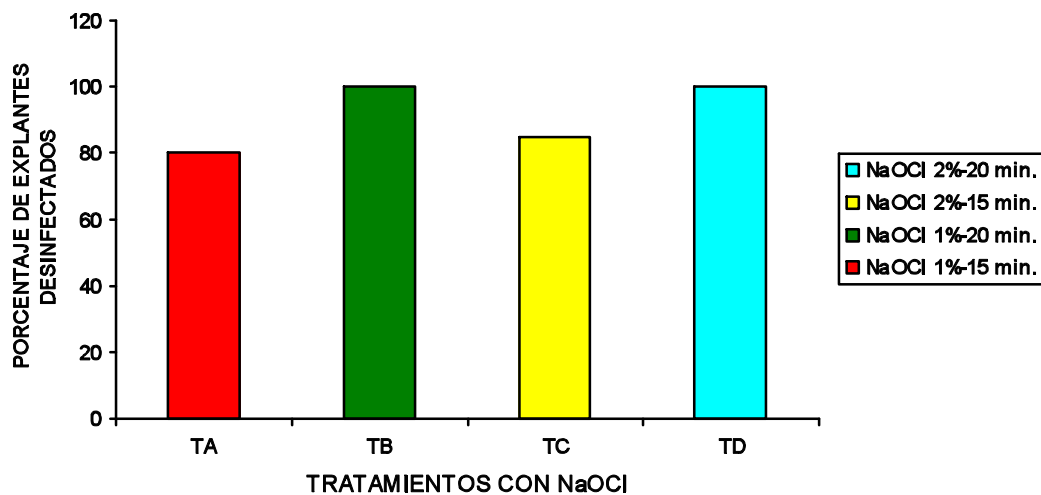


**Figura 8.** Relación entre la distancia de ubicación de los explantes a la base del tallo en la planta madre y el tiempo de formación de brotes.

#### 4.3 DESINFECCIÓN DE EXPLANTES.

En esta etapa se observó la presencia de colonias de hongos, bacterias y, en algunos casos de levaduras, figuras 9 y 10, en los tratamientos con  $H_2O_2$  2% por 45 segundos, etanol 70% por 45 segundos y NaOCl 1% y 2% por 15 minutos cada uno, presentando un porcentaje de contaminación del 20% y

15% respectivamente. Los tratamientos con  $H_2O_2$  2% por 45 segundos, etanol 70% por 45 segundos y NaOCl 1% y 2% por 20 minutos respectivamente, fueron eficientes en la eliminación de patógenos en los explantes alcanzándose un 100% en la desinfección, pero el tratamiento con NaOCl 2% por 20 minutos causó lesiones en el 17,5% de los explantes, figura 10.



**Figura 10.** Porcentaje de explantes que no presentaron contaminación por acción de los diferentes tratamientos con NaOCl.

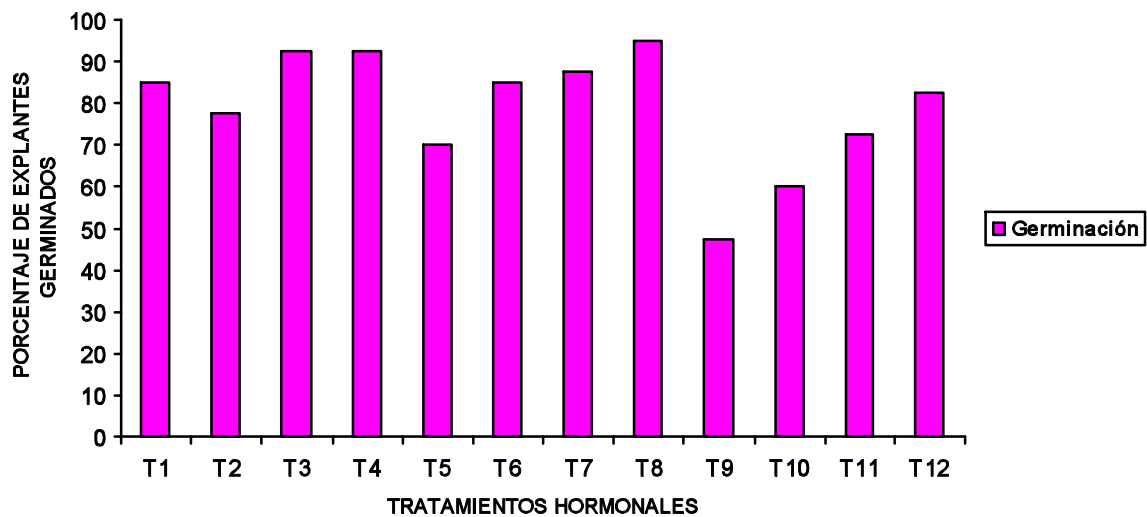
## **4.4 ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES.**

### **4.4.1 Escisión de explantes.**

En esta fase del establecimiento, se observó que en explantes enteros germinaba una sola de las yemas mientras que la adyacente permanecía inhibida. En explantes cortados longitudinalmente las yemas separadas germinaban simultáneamente, formando cada una 2 brotes y en menor tiempo que en explantes enteros, figura 11.

### **4.4.2 Influencia de la combinación hormonal ANA-KIN sobre la formación de brotes en los explantes.**

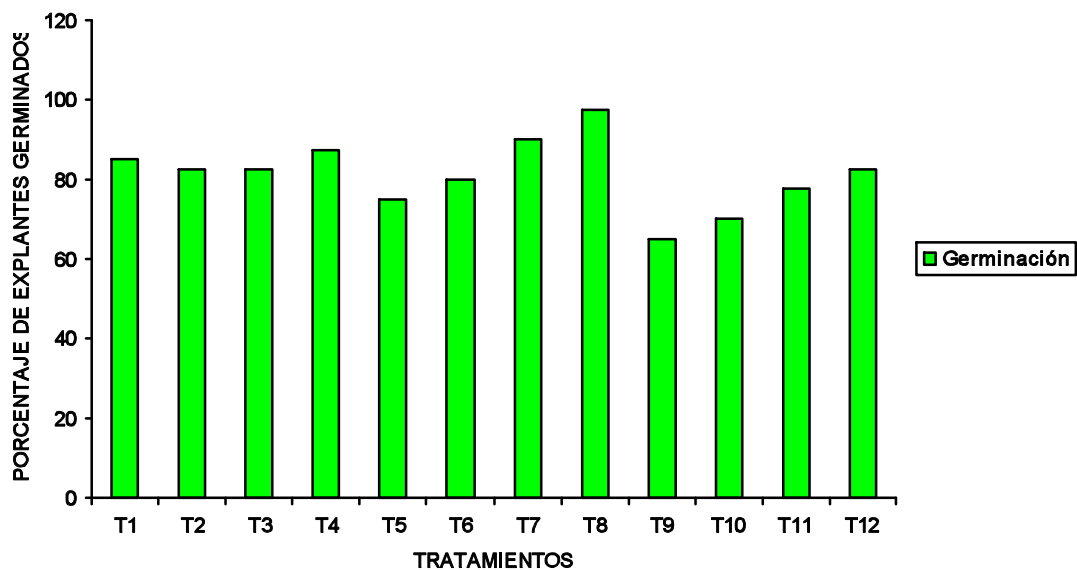
En el desarrollo de este ensayo, se observó que la mayoría de los explantes germinaron en cada uno de los tratamientos, siendo el más eficiente el T8 (ANA 0,1mg/l-KIN 0,3 mg/l ) con un porcentaje de germinación del 95%, figura 12. Además, se verificó la formación de callos en algunos explantes, sometidos al tratamiento T9 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,0 mg/l) , figuras 13 y 14.



**Figura 14.** Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-KIN sobre la germinación de explantes de ñame espino (*D. rotundata*) después de 10 días de incubación en etapa de establecimiento. T1 (Patrón sin hormonas), T2 (ANA 0,0 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T3 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T4 (ANA 0,0 mg/l-KIN 0,3 mg/l), T5 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,0 mg/l), T6 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T7 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T8 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,3 mg/l), T9 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,0 mg/l), T10 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T11 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T12 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,3 mg/l).

#### 4.4.3 Influencia de la combinación hormonal ANA-BAP sobre la formación de brotes en los explantes.

En esta etapa se observó una alta tasa de germinación en los diferentes tratamientos aplicados. El tratamiento T8 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,3 mg/l) presentó el mayor porcentaje de germinación (97,5%) con formación de 2 brotes por segmento cultivado, figura 15, mientras que el T9 presentó el porcentaje más bajo (67,5%) con formación de callo en algunos explantes, figura 16.



**Figura 16.** Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BAP sobre la germinación de explantes de ñame espino (*D. rotundata*) después de 10 días de incubación en etapa de establecimiento. T1 (Patrón sin hormonas), T2 (ANA 0,0 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T3 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T4 (ANA 0,0 mg/l-BAP 0,3 mg/l), T5 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,0 mg/l), T6 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T7 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T8 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,3 mg/l), T9 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,0 mg/l), T10 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T11 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T12 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,3 mg/l).

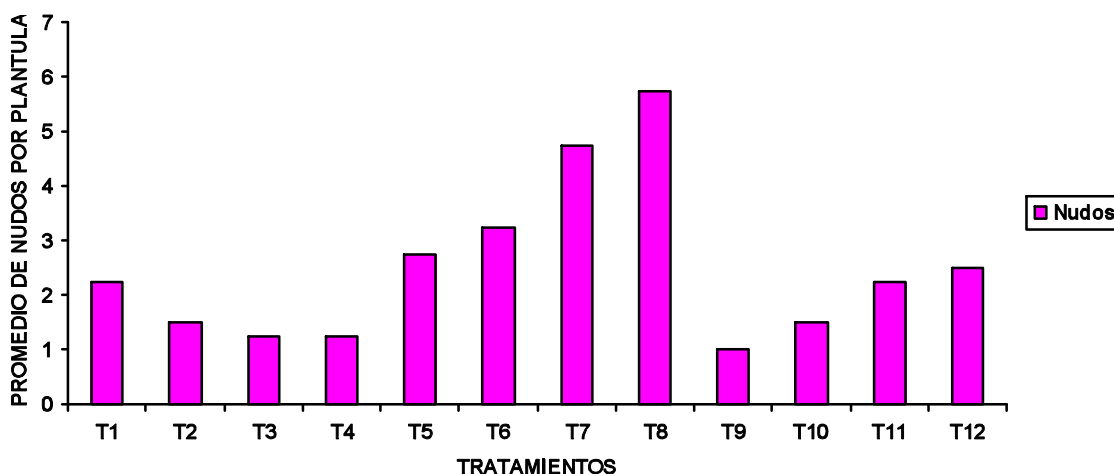
## 4.5 MULTIPLICACIÓN DE BROTES.

### 4.5.1 Determinación de la masa crítica de los explantes.

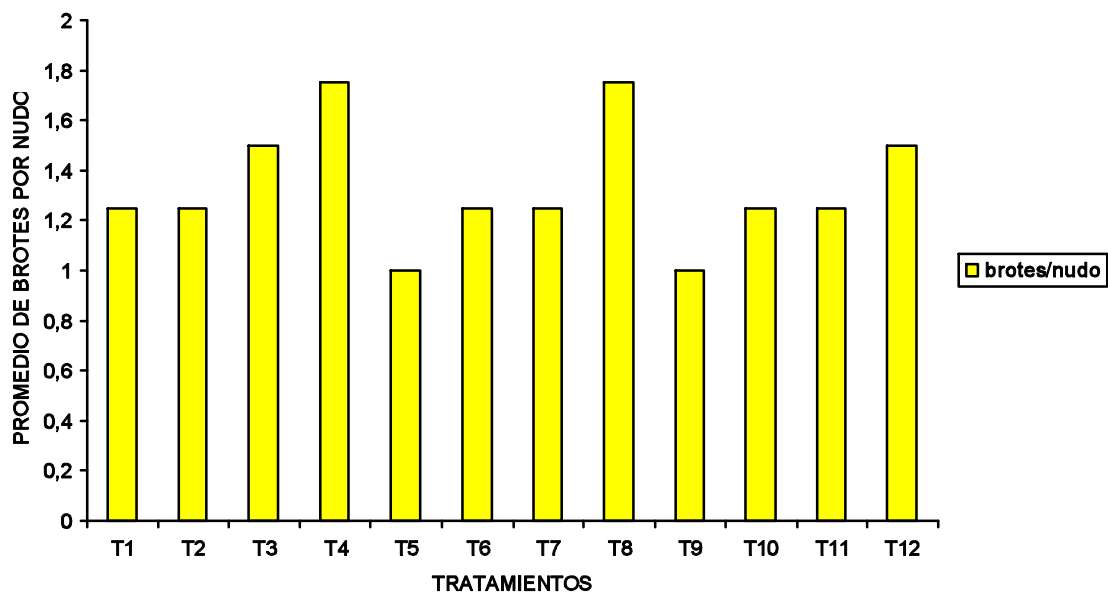
Se observó que los segmentos nodales de 0,3 cm de longitud no formaron brotes durante el tiempo de incubación, mientras que los segmentos de 0,5, 0,7 y 1 cm germinaron en 10 días con vigorosidad, figura 17

#### 4.5.2 Influencia de la combinación hormonal ANA-KIN sobre la multiplicación de brotes.

En esta fase de la multiplicación, se pudo apreciar la regeneración de pocos brotes en los segmentos cultivados. Sin embargo, fue notoria la formación de varios nudos en cada uno de los brotes, figura 18. El tratamiento T8 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,3 mg/l) fue el más eficiente en la formación de nudos, con un promedio de 5,75 nudos por brote, figura 19, mientras que el tratamiento T4 (ANA 0,0 mg/l-KIN 0,3 mg/l) fue más eficiente en la inducción de múltiples brotes con un promedio de 1,75 brotes por nudo, figura 20.



**Figura 18.** Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-KIN sobre la inducción de nudos en plántulas de ñame espino (*D. rotundata*) después de 30 días de incubación en etapa de multiplicación. T1 (Patrón sin hormonas), T2 (ANA 0,0 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T3 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T4 (ANA 0,0 mg/l-KIN 0,3 mg/l), T5 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,0 mg/l), T6 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T7 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T8 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,3 mg/l), T9 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,0 mg/l), T10 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T11 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T12 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,3 mg/l).



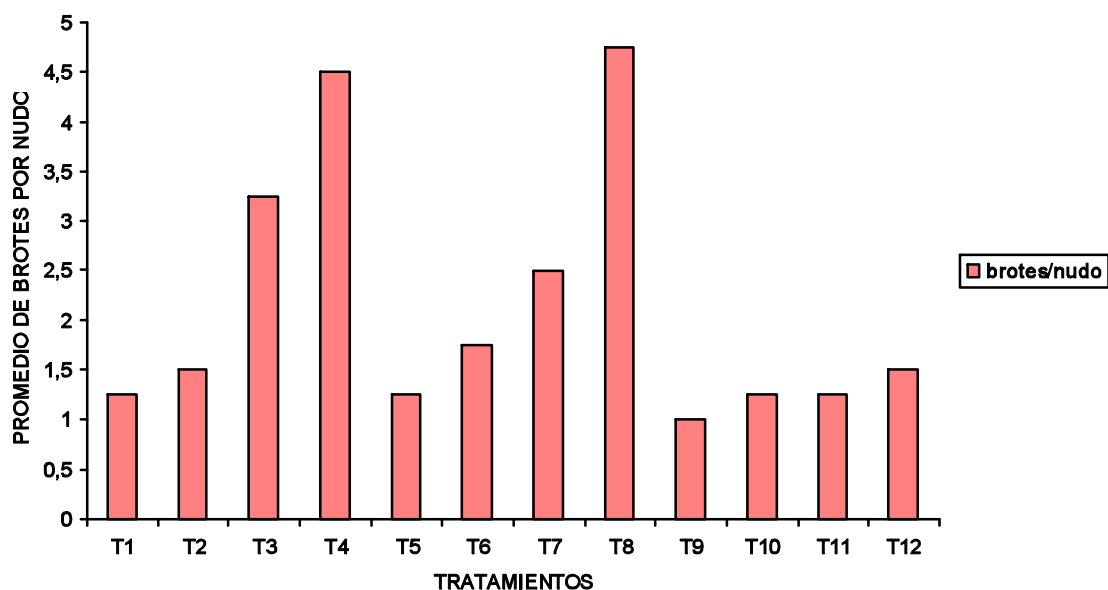
**Figura 20.** Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-KIN sobre la formación de múltiples brotes en los explantes de ñame espino (*D. rotundata*) después de 30 días de incubación en etapa de multiplicación. T1 (Patrón sin hormonas), T2 (ANA 0,0 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T3 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T4 (ANA 0,0 mg/l-KIN 0,3 mg/l), T5 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,0 mg/l), T6 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T7 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T8 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,3 mg/l), T9 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,0 mg/l), T10 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,1 mg/l), T11 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,2 mg/l), T12 (ANA 0,2 mg/l-KIN 0,3 mg/l).

#### 4.5.3 Influencia de la combinación hormonal ANA-BAP sobre la multiplicación de brotes.

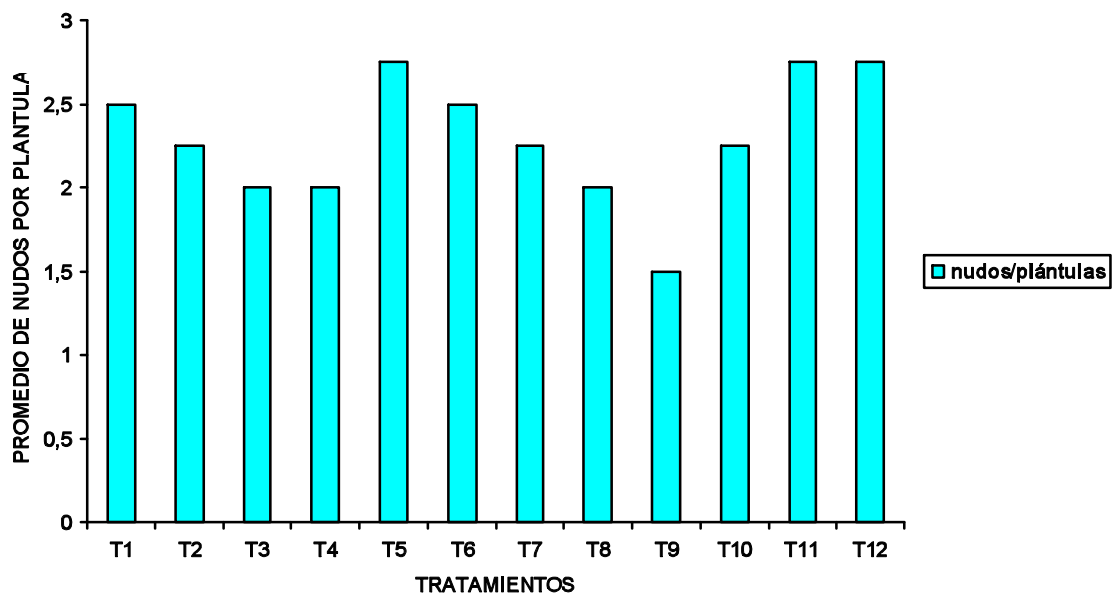
En esta etapa se observó la formación de múltiples brotes por cada segmento cultivado, siendo el tratamiento T8 (ANA 0,1 mg/l-KIN 0,3 mg/l) el más eficiente en la multiplicación de brotes, con un promedio de 4,75 brotes por nudo, figuras 21 y 22. El tratamiento T4 (ANA 0,0 mg/l-BAP 0,3 mg/l)



indujo, en algunos casos, la formación de una masa foliosa sin distinción de tallos, mientras que los tratamientos T5(ANA0,1 mg/l-BAP 0,0 mg/l), T10 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,1mg/l) y T12 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,3 mg/l) fueron los más eficientes en la formación de nudos con un promedio de 2,75 nudos por brote cada uno, figuras 23 y 24.



**Figura 23.** Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BAP sobre la formación de múltiples brotes por nudo de ñame espino (*D. rotundata*) después de 30 días de incubación en etapa de multiplicación. T1 (Patrón sin hormonas), T2 (ANA 0,0 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T3 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T4 (ANA 0,0 mg/l-BAP 0,3 mg/l), T5 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,0 mg/l), T6 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T7 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T8 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,3 mg/l), T9 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,0 mg/l), T10 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T11 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T12 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,3 mg/l).

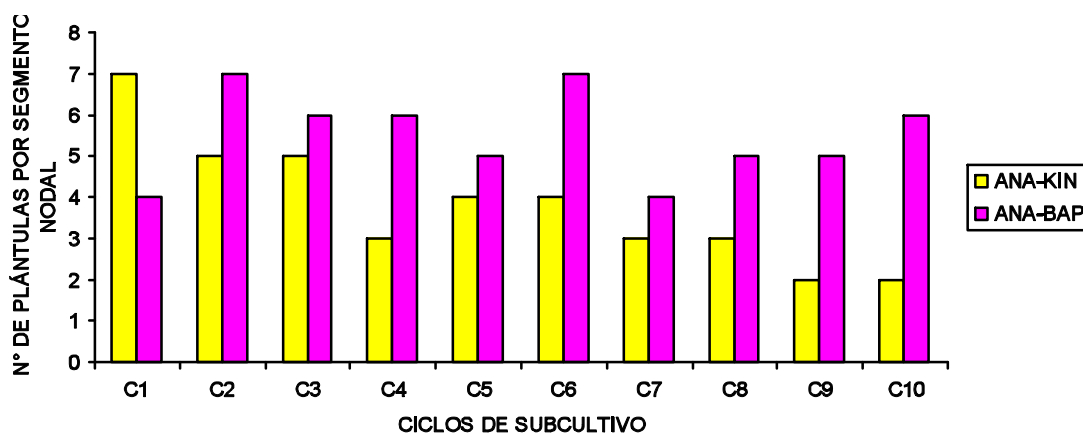


**Figura 24.** Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BAP sobre la inducción de nudos en plántulas de ñame espino (*D. rotundata*) después de 30 días de incubación en etapa de multiplicación. T1 (Patrón sin hormonas), T2 (ANA 0,0 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T3 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T4 (ANA 0,0 mg/l-BAP 0,3 mg/l), T5 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,0 mg/l), T6 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T7 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T8 (ANA 0,1 mg/l-BAP 0,3 mg/l), T9 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,0 mg/l), T10 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,1 mg/l), T11 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,2 mg/l), T12 (ANA 0,2 mg/l-BAP 0,3 mg/l).

#### 4.5.4 Frecuencia de subcultivos.

En esta etapa se pudo observar la aparición de brotes vigorosos en un periodo de 7 días de incubación en los primeros tres subcultivos, bajo la acción de la combinación hormonal ANA-KIN. En los siguientes subcultivos se observó un deterioro progresivo del material vegetal disminuyendo la tasa de propagación, figura 25. Los subcultivos realizados con la combinación ANA-BAP formaron brotes vigorosos a los 10 días de

incubación en los primeros cinco subcultivos. El periodo de formación de brotes aumentó a 15 días de incubación en los subcultivos subsiguientes, sin embargo, el material vegetal mantuvo su vigorosidad y una tasa de propagación relativamente constante. Figura 26 y 27, anexo 11.

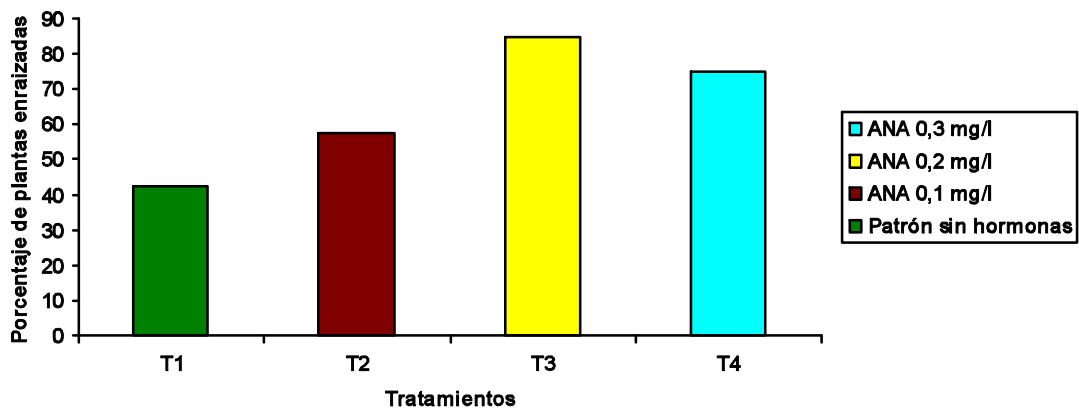


**Figura 26.** Influencia de las combinaciones hormonales **ANA-KIN** y **ANA-BAP** sobre la obtención de plantas in vitro de ñame Espino (*D. rotundata*) en 10 ciclos de subcultivo de 30 días cada uno.

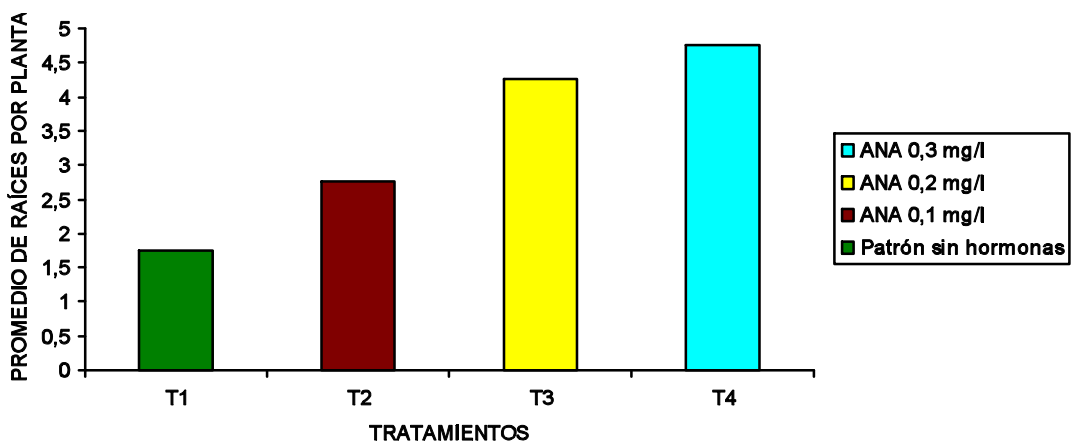
#### 4.6 ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS.

En esta etapa se pudo apreciar la formación de raíces en los tratamientos T3 (ANA 0,2 mg/l) y T4 (ANA 0,3 mg/l) presentando un porcentaje de plantas enraizadas del 85% y 75% respectivamente, figura27. El T4 presentó el

mayor promedio de raíces por planta (4,75 raíces) pero indujo la formación de callos, figura 28 y 29.



**Figura 28.** Efecto de las diferentes concentraciones de ANA sobre el porcentaje de plántulas enraizadas de ñame espino (*D. rotundata*) después de 30 días de incubación.



**Figura 29.** Influencia de las diferentes concentraciones de ANA sobre el promedio de raíces en plántulas de ñame espino (*D. rotundata*) después de 30 días de incubación

#### 4.7 EFECTO DEL SELLADO SOBRE LA HUMEDAD RELATIVA DEL INTERIOR DEL RECIPIENTE DE CULTIVO Y SU INFLUENCIA EN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS IN VITRO DE ÑAME ESPINO (*D. rotundata*).

Se observó que en las paredes internas de los recipientes de cultivo sellados herméticamente con papel aluminio + PPA había una condensación excesiva de gotas de agua, y algunas plantas crecidas bajo este sistema mostraron signos de vitrificación y marchites. El medio de cultivo en el interior del frasco mantuvo su volumen, figura 30. En los recipientes sellados con PPA se observó que las plántulas crecían vigorosas sin señales de vitrificación, pero después de un periodo de incubación prolongado (30 días) mostraban signos de marchites y al poco tiempo morían. Además, se pudo apreciar que el volumen del medio de cultivo se redujo notablemente, figura 31.

En los recipientes sellados con el sistema combinado (papel aluminio perforado + PPA), se observó que las plántulas crecían con mucho vigor sin presentar signos de marchites o vitrificación. De igual manera se observó que el medio de cultivo se redujo moderadamente permitiendo tiempos más

largos de incubación (45 días) que con el sello de PPA. La condensación de gotas de agua en las paredes internas del recipiente de cultivo se redujo considerablemente en comparación a la alta humedad en el interior de los recipientes sellados herméticamente con papel aluminio + PPA, figura 32.

En la etapa de transferencia a invernadero, se observó que las plantas provenientes de recipientes sellados con PPA y sistema combinado presentaron un 95% y 97,5% de supervivencia respectivamente, figura 33, mientras que las plantas provenientes de recipientes sellados herméticamente con papel aluminio + PPA presentaron un 47,5% de supervivencia.

## **5. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

### **5.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRE.**

El uso de plantas madre de 2 a 3 meses de edad para la obtención de explantes radica en su alta capacidad de regeneración después del corte de los segmentos nodales. La poda periódica de los ápices activa el crecimiento de las yemas axilares formando nuevas ramas con varios nudos aptos para la micropropagación.

### **5.2 SELECCIÓN DE EXPLANTES.**

La respuesta de los explantes a la velocidad de germinación y a la acción del NaOCl en la desinfección depende de su ubicación en la planta madre. A medida que los explantes se alejan de la base del tallo germinan con mayor velocidad, pero disminuye la tolerancia al NaOCl. Esto demuestra que los tejidos jóvenes responden con mayor eficiencia al medio de cultivo que otros más viejos y de mayor consistencia; sin embargo, existe un límite en el cual

la tolerancia de los explantes al NaOCl es mínima o casi nula. Estos fenómenos también fueron discutidos por Roca y Mroginski (1991), quienes afirman que la respuesta de los explantes al medio de cultivo puede variar notablemente con el estado fisiológico y la edad ontogénica de los mismos. De igual manera, Hartmann y Kester (1992) expresan que los tejidos más jóvenes como las puntas de brotes terminales o axilares se regeneran mejor que otros tejidos de tallo más viejos y maduros. No se encontraron reportes al respecto para el género *Dioscorea* y en especial para la especie *D. rotundata* que permitieran hacer una comparación más precisa de estos resultados.

### 5.3 DESINFECCIÓN DE EXPLANTES.

El uso de concentraciones relativamente bajas de NaOCl presenta poca eficiencia en la eliminación de patógenos en los explantes cuando se utilizan tiempos relativamente cortos de inmersión. Esto evita que el NaOCl penetre totalmente en las partes más profundas de los tejidos donde posiblemente se alojan los patógenos permitiendo que éstos proliferen en el medio de cultivo.



La contaminación presentada en los tratamientos con NaOCl 1% y 2% por 15 minutos respectivamente, pudo ser causada por alguno de estos aspectos.

Las lesiones sufridas por los explantes sometidos a concentraciones de NaOCl relativamente altas (2%) utilizadas con tiempos de inmersión relativamente largos (20 minutos), pudieron ser ocasionadas por la penetración excesiva del NaOCl en los tejidos, lo cual pudo destruir las células meristemáticas impidiendo la germinación. El tratamiento con NaOCl 1% por 20 minutos presentó un equilibrio entre la concentración y el tiempo de inmersión, lo que permitió realizar una desinfección eficaz sin lesionar los tejidos de los explantes.

Mantell (1979), obtuvo buenos resultados en la desinfección de segmentos nodales de *D. rotundata* extraídos de plantas madre en condiciones de invernadero utilizando concentraciones relativamente bajas de NaOCl (0,5 %) por tiempos de inmersión relativamente cortos (5 minutos). Lo anterior sugiere que la eficiencia en la desinfección también depende de las condiciones asépticas en las que se establezcan las plantas madre.

Con respecto a lo anterior, Hartmann y Kester (1992) afirman que tanto la efectividad del tratamiento de desinfección como el daño al tejido viviente aumentan como respuesta al tiempo-dosis, de manera que se debe buscar un equilibrio entre estos dos factores.

El análisis estadístico para la desinfección, anexo 12, indicó que existían diferencias significativas entre los tratamientos.

## **5.4 ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES.**

### **5.4.1 Escisión de explantes.**

Este procedimiento permitió aprovechar al máximo el material vegetal, ya que, en algunos casos, los segmentos nodales enteros pueden presentar inhibición en el crecimiento de una de sus yemas con el fin de economizar nutrientes y asegurar su supervivencia. El corte longitudinal del segmento nodal propicia el crecimiento independiente y simultáneo de ambas yemas, debido a que cada una por separado puede absorber los nutrientes necesarios para su crecimiento, lo cual favorece la tasa de germinación.

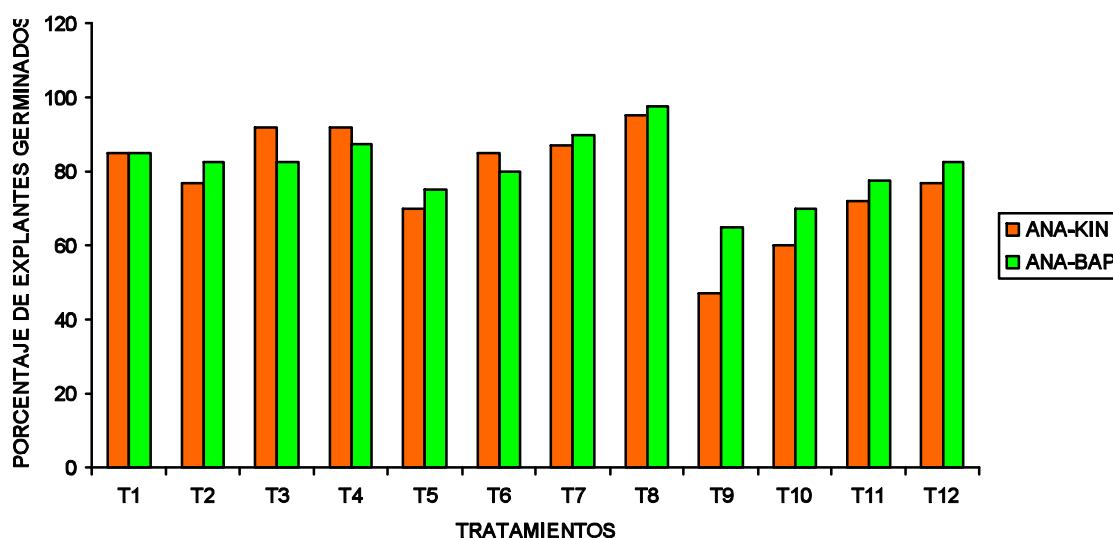
#### **5.4.2 Influencia de la combinación hormonal ANA-KIN y ANA-BAP sobre la inducción de brotes en los explantes.**

La inducción de brotes en los explantes es favorecida por un equilibrio entre la concentración de auxina y citokinina en el medio de cultivo. El tratamiento T8 para la combinación hormonal ANA-KIN en concentraciones de 0,1 mg/l y 0,3 mg/l respectivamente, indujo eficientemente la formación de brotes en los explantes y coincidencialmente, el T8 para la combinación hormonal ANA-BAP en concentraciones de 0,1 mg/l y 0,3 mg/l respectivamente, resultó ser aun más eficiente en la formación de brotes, figura 34. Esto sugiere que las concentraciones relativamente altas de citokininas combinadas con concentraciones bajas de auxina favorecen la formación de brotes en los explantes.

La adición al medio de cultivo de auxinas en concentraciones relativamente altas puede inducir la formación de callo en los explantes impidiendo la formación del brote, sólo si éstos no cuentan con una cantidad adecuada de citokinina en sus tejidos que evite este fenómeno. La presencia de callo en

algunos explantes sometidos al tratamiento T9 para las combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP, en donde solo se adiciona ANA en concentración de 0,2 mg/l, pudo ser ocasionada por este fenómeno.

Si se adiciona solamente citokinina al medio de cultivo en concentraciones relativamente altas se puede detener la dominancia apical y por tanto los brotes crecidos no elongarían o bien formarían una masa foliosa sin tallos como sucedió en el tratamiento T4 para la combinación hormonal ANA-BAP, en el cual sólo se adicionó esta última en concentración de 0,3 mg/l.



**Figura 34.** Comparación entre los diferentes tratamientos de las combinaciones hormonales **ANA-KIN** y **ANA-BAP** con respecto a la inducción de brotes de ñame espino (*D. rotundata*) representada por el porcentaje de explantes germinados después de 10 días en etapa de establecimiento.

Con respecto a la gráfica anterior, se puede decir que la eficiencia de la combinación ANA-BAP es mayor que la que presentó la combinación ANA-KIN en cuanto a la inducción de brotes. Además, al suprimir las citkininas (KIN o BAP) del medio de cultivo, como sucede en el T5 y T9, se observa una disminución apreciable en el porcentaje de explantes germinados, pero también es cierto que la sola presencia de estas citokininas no muestra los mejores resultados (T3 y T4), haciéndose evidente que la presencia de auxinas (ANA) en el medio de cultivo en concentraciones relativamente bajas (0,1 mg/l) favorece aún más la inducción de brotes (T8).

Los resultados anteriores no concuerdan con los publicados por Cortés y Lii-Jang (1983), quienes obtuvieron la mejor respuesta en la inducción de brotes en los explantes de *D. rotundata* al adicionar al medio de cultivo concentraciones relativamente elevadas y en proporciones iguales de ácido indolacético (AIA) y KIN (2 mg/l cada una). De igual manera difieren de los resultados obtenidos por Shou (1988), quien obtuvo plántulas in vitro de *D. rotundata* adicionando al medio de cultivo concentraciones relativamente bajas de Kinetina (0,5 mg/l<sup>-1</sup>). Estas variaciones se deben posiblemente a la

influencia del contenido natural de auxinas y citokininas que presentan los explantes en el momento del corte.

El análisis estadístico, anexo 13, indicó que existían diferencias significativas entre los tratamientos de las diferentes combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP.

## **5.5 MULTIPLICACIÓN DE BROTES.**

### **5.5.1 Determinación de la masa crítica de los explantes.**

El tamaño del segmento nodal influyó directamente en la tasa de multiplicación de brotes. Los segmentos nodales menores de 0.5 cm de longitud necrosan rápidamente impidiendo la formación del brote, mientras que segmentos iguales o mayores a 0.5 resisten el daño causado por el corte y se regeneran con mayor facilidad. Hartmann y Kester (1992) afirman que el éxito de la multiplicación estriba en que se produzcan plántulas uniformes sin enraizar, de tamaño apropiado, que se recuperen con prontitud después de su transferencia y que empiecen a crecer de inmediato, lo cual depende de la

masa crítica mínima del explante. Además plantean que el tamaño óptimo del propágulo y el medio de cortarlos y separarlos varía en las diferentes especies. Generalmente existe una masa crítica de tejido que debe alcanzar el explante, en la cual se pueden hacer cortes de un tamaño que se obtenga una producción rápida y uniforme en los subcultivos siguientes. No se encontraron reportes sobre este aspecto para ñame espino (*D. rotundata*) que permitieran realizar un mejor análisis de estos resultados.

### **5.5.2 Influencia de las combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP sobre la multiplicación de brotes.**

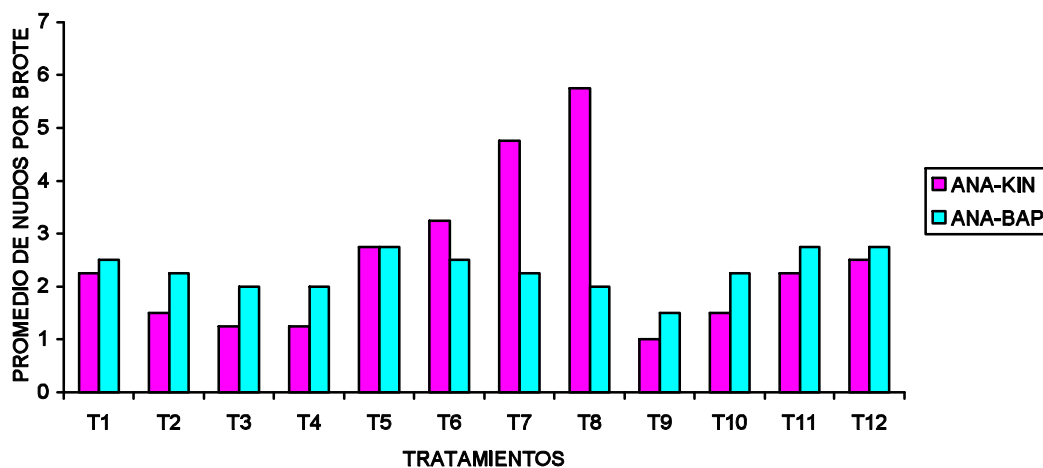
El tratamiento T8 para la combinación hormonal ANA-KIN en concentraciones de 0,1 mg/l y 0,3 mg/l respectivamente, resultó eficiente en la formación de múltiples nudos en las plántulas (un promedio de 5,75 nudos) en 30 días de incubación, de los cuales se pudo obtener una producción continua de brotes axilares debido a la dominancia apical prolongada de los brotes. Mantell (1978), obtuvo un promedio de 3 a 5 nudos en un periodo de incubación de 14 a 20 días en *D. alata* y *D. rotundata*. El tratamiento T8 para la combinación hormonal ANA-BAP

(0,1 mg/l y 0,3 mg/l) indujo la formación múltiples brotes adventicios (un promedio de 4,75 brotes por nudo cultivado) des pués de 30 días de incubación. Pierik (1990), plantea que la proliferación de brotes depende, al igual que en el establecimiento, de un equilibrio entre las concentraciones de auxinas y citokininas que aseguren ya sea la producción continuada de brotes axilares o la iniciación de brotes adventicios en la masa de tejido de tipo callo que se forma en la base de los tallos.

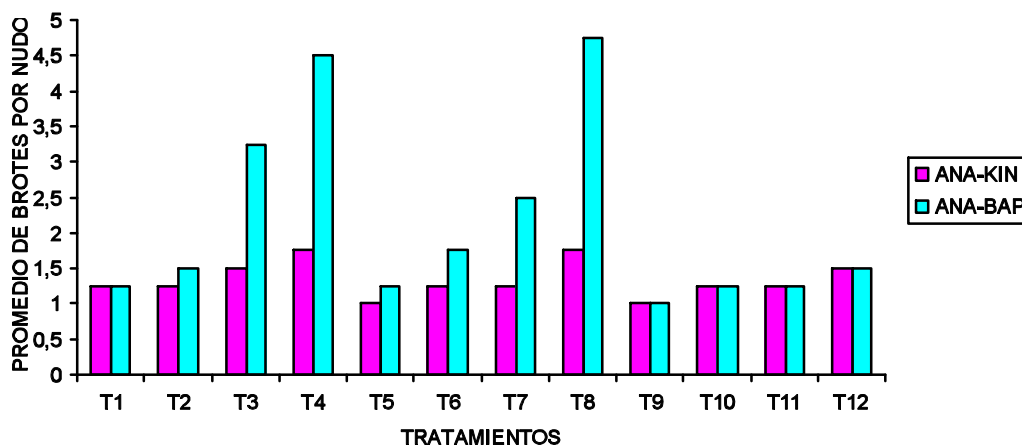
La presencia de (ANA 0,1 mg/l) en el medio de cultivo favoreció la dominancia apical en los brotes, ya que las auxinas en concentraciones relativamente bajas estimulan la elongación celular y la expansión de los tejidos y más aún si van acompañadas de una citokinina en concentraciones relativamente bajas. La adición de 0,3 mg/l de KIN favoreció la acción del ANA estimulando la dominancia apical, mientras que la adición de BAP en la misma concentración disminuyó la acción de ANA y por lo tanto la dominancia apical, promoviendo la formación de brotes adventicios en la base de los tallos. Esto indica que el BAP ejerce una acción supresora mucho mayor sobre el ANA que la KIN, figuras 35 y 36. El análisis estadístico, anexo 14, indicó que existían diferencias altamente significativas entre los



diferentes tratamientos de las combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP.



**Figura 35.** Comparación entre los diferentes tratamientos de las combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP con respecto a la dominancia apical representada en el promedio de nudos en los brotes de ñame espino (*D. rotundata*) después de 30 días en etapa de multiplicación.



**Figura 36.** Comparación entre los diferentes tratamientos de las combinaciones hormonales ANA-KIN y ANA-BAP con respecto a la inducción de brotes adventicios de ñame espino (*D. rotundata*) representada en el promedio de brotes por nudo cultivado después de 30 días en etapa de multiplicación.

### 5.5.3 FRECUENCIA DE SUBCULTIVOS.

La combinación hormonal ANA-KIN fue menos eficiente para la propagación continua de los brotes debido al deterioro progresivo de los propágulos. Con este método se obtuvo una tasa promedio de propagación de 3,8 plántulas a partir de un segmento nodal en 10 ciclos de subcultivo de 30 días cada uno. Si se mantiene esta tasa de propagación es posible obtener hasta 3.011 plántulas en 6 meses de cultivo. Mantell (1978) reportó una tasa de propagación en *D. alata* y *D. rotundata* de 3 plántulas a partir de un segmento nodal en ciclos de subcultivo de 14 a 20 días, pudiéndose obtener hasta 65,000 plántulas en 6 meses de cultivo.

La combinación ANA-BAP permitió realizar 10 ciclos de subcultivo de 30 días cada uno obteniéndose una tasa promedio de propagación de 5,5 brotes por nudo cultivado. Con esta tasa de propagación se pueden obtener hasta 27.681 plántulas en un periodo de cultivo de 6 meses, cuadro 13.

**Cuadro 13.** Tasas de propagación de ñame Espino (*D. rotundata*) en 10 ciclos de subcultivo a partir de un segmento nodal.

MS básico + Combinaciones hormonales	Número de plantas por ciclo de subcultivo a partir de un segmento nodal										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	X
<b>ANA</b> 0.1 mg/l + <b>KIN</b> 0.3 mg/l	7	5	5	3	4	4	3	3	2	2	3.8
<b>ANA</b> 0.1 mg/l + <b>BAP</b> 0.3 mg/l	4	7	6	6	5	7	4	5	5	6	5.5

C = ciclos de 30 días de incubación.

## 5.6 ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS.

La eficiencia de los tratamientos T3 (ANA 0,2 mg/l) y T4 (0,3 mg/l) en la formación de raíces en plántulas, se debió a la existencia de un equilibrio entre las concentraciones de ANA y los niveles de sacarosa y de sales inorgánicas en el medio de cultivo. Roca y Mroginski (1991), demostraron que los requerimientos de auxina aumentan con los niveles de sacarosa, lo que indica que ésta, en concentraciones relativamente altas, ejerce un efecto inhibitorio en el enraizamiento. En este trabajo la reducción de sacarosa al 1,5% favoreció la formación de raíces en las plántulas.

La presencia de callo en algunas plántulas sometidas al tratamiento T4 produjo un efecto inhibitorio en el enraizamiento, y en otros casos se afectó

desfavorablemente la elongación de las raíces, este último aspecto no es nocivo para la planta, pero le resta calidad al producto final. La reducción de las sales en el medio de cultivo ayudó en gran parte a que la planta se viera obligada a elongar sus raíces en busca de los nutrientes necesarios para su desarrollo. De igual forma la reducción del fotoperiodo incrementó la producción de raíces en las plantas. Devlin (1980), demostró que la intensidad lumínica ejercía un efecto inhibitorio en la elongación de los tejidos de tallo y raíces debido a la inactivación de las auxinas por efecto de la luz.

El análisis estadístico para el enraizamiento, anexo 15, indicó que existió una diferencia significativa entre los tratamientos con ANA con respecto al porcentaje de plantas enraizadas y al número de raíces por planta.

### **5.7 EFECTO DEL SELLADO SOBRE LA HUMEDAD RELATIVA DEL INTERIOR DE LOS RECIPIENTES DE CULTIVO Y SU INFLUENCIA EN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS IN VITRO DE ÑAME ESPINO (*D. rotundata*).**

El sistema de sellado utilizado en los recipientes de cultivo presentó una estrecha relación con el grado de humedad relativa en el interior de los recipientes y con el crecimiento de las plantas in vitro. En recipientes sellados con cierre hermético de papel aluminio + PPA, el intercambio gaseoso de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y etileno se dificulta mucho o es completamente nulo. De Profet (1986), citado por Pierik (1990), demostró que la acumulación de CO<sub>2</sub> y etileno pueden reducir el crecimiento del material vegetal produciendo plantas cloróticas y que la alta humedad relativa del interior del recipiente de cultivo puede causar vitrificación en las plantas. Pierik (1990) observó además, que el cierre con una película plástica de propileno permitía el intercambio gaseoso y la evaporación excesiva de agua. El sistema de sellado combinado controló en cierto grado la falta de intercambio gaseoso y la pérdida excesiva de agua por evaporación.

Las plantas provenientes de recipientes sellados con papel aluminio + PPA presentaron dificultad en la transferencia a condiciones de invernadero marchitándose al poco tiempo después de la transferencia, mientras que las provenientes de recipientes sellados con PPA y sistema combinado se aclimataron rápidamente, debido tal vez a las condiciones fisiológicas de los estomas de sus hojas.

Según Debergh y Zimmerman (1991), los estomas pueden sufrir daños morfológicos y fisiológicos en condiciones de humedad excesiva, así como también por falta del intercambio gaseoso al que es sometida la planta en recipientes sellados herméticamente. De igual manera, Collín Y Edwards (1998), determinaron que la baja exposición a la luz en recipientes herméticos retarda el engrosamiento de la lámina foliar y la formación de la cutícula en hojas.

## CONCLUSIONES

- La utilización de plantas madre de dos a tres meses de edad propicia la obtención de explantes (segmentos nodales) anatómica y fisiológicamente adecuados para la micropropagación.
- El uso de la secuencia de desinfección iniciada con peróxido de hidrógeno 2% por 45 segundos, seguida de una inmersión en etanol 70% por 30 segundos y una exposición en hipoclorito de sodio 1% por 20 minutos, favorece la eliminación de contaminantes y la conservación de los tejidos en los explantes.
- La respuesta de los segmentos nodales frente a los diferentes tratamientos de desinfección y a la germinación en el medio de cultivo, depende en gran parte de las características anatómicas y fisiológicas de los mismos.

- El corte longitudinal de los segmentos nodales permite aprovechar con mayor eficiencia el material vegetal utilizado, debido a que las yemas separadas no se inhiben entre si favoreciendo la tasa de germinación.
- La combinación hormonal **ANA-KIN** en concentraciones de 0,1 mg/l y 0,3 mg/l respectivamente, favorece el desarrollo de brotes en los explantes y la formación de numerosos nudos en las vitroplantas.
- La formación de múltiples brotes en los explantes se ve favorecida por el uso de la combinación hormonal **ANA-BAP** en concentraciones de 0,1 mg/l y 0,3 mg/l respectivamente, aunque no favorece eficientemente el desarrollo de nudos en las vitroplantas.
- Las plantas desarrolladas bajo la combinación hormonal **ANA-KIN** presentan características de consistencia y color de tallos y hojas mas intensas que las plantas desarrolladas bajo la combinación hormonal **ANA-BAP**.
- El tamaño del segmento nodal en los subcultivos es pieza clave en el éxito de la micropropagación, ya que, de ello depende la resistencia de



éstos frente a la necrosis ocasionada por el corte y por lo tanto la germinación del nuevo brote.

- La conservación del material vegetal en cada ciclo de subcultivo es propiciada por la adición al medio de cultivo de la combinación hormonal **ANA-BAP**, la cual induce un rejuvenecimiento en los brotes formados evitando el deterioro progresivo en cada ciclo.
- La reducción de sales MS al 50% y de sacarosa al 1,5% acompañada de la adición de **ANA** en concentración de 0,2 mg/l en el medio de cultivo, favorece la formación de raíces en las vitroplantas sin inducción de callo o raíces adventicias.
- El uso del sistema combinado para el sellado de los recipientes de cultivo consistente el papel aluminio perforado cubierto con PPA, permite controlar las condiciones ambientales in vitro obteniéndose plantas bien desarrolladas y preadaptadas a las condiciones del medio externo.

- El éxito en la etapa de transferencia de las plántulas a condiciones de invernadero depende, en gran parte, del control de las condiciones ambientales in vitro así como también del cuidado proporcionado en el invernadero.

## RECOMENDACIONES

- Para prolongar la conservación de las plantas madre es recomendable tomar explantes solamente por encima de 1 metro, lo cual permite una recuperación rápida de la planta formando nuevas ramas que se pueden utilizar posteriormente para la obtención de explantes.
- Es indispensable mantener las plantas madre aisladas de lugares expuestos al polvo o la humedad excesiva para disminuir el riesgo de contaminación en los explantes que de ellas se obtengan.
- El lavado preliminar de los explantes con detergente comercial ayuda a controlar el grado de contaminación cuando se realiza agitando vigorosamente por varios minutos y con cambios frecuentes de agua destilada.

- El uso de NaOCl 2% por 20 minutos en la desinfección solo se recomienda cuando se utilicen explantes relativamente adultos y consistentes, ya que, los explantes muy jóvenes son susceptibles a este tratamiento en cuanto a la integridad de sus tejidos.
  
- El corte longitudinal de los explantes es recomendable cuando se desea aprovechar al máximo el material vegetal utilizado y acelerar la tasa de germinación.
  
- Con el fin de ahorrar tiempo e insumos químicos se puede utilizar el mismo medio de cultivo para el establecimiento y para la etapa de multiplicación, ya que, favorece la inducción de brotes en los explantes y el desarrollo de las nuevas plántulas.
  
- La utilización de la combinación hormonal **ANA-KIN** o **ANA-BAP** se realizará teniendo en cuenta el objetivo que se persiga en la micropropagación. Mientras que la primera favorece el desarrollo de nudos en las plántulas, la segunda induce la formación de múltiples brotes en los nudos subcultivados.

- Para obtener un enraizamiento abundante y vigoroso basta con eliminar las citokininas (**KIN** o **BAP**) del medio de cultivo y adicionar auxinas (**ANA**) en concentraciones relativamente altas, con disminución de las sales MS y de sacarosa a la mitad y del fotoperiodo a 8 horas luz con una intensidad lumínica de 70 a 80 mol . m . s.
  
- Es necesario flamear los materiales utilizados en el momento de la manipulación en cámara del material vegetal antes y después del corte de cada explante, lo cual reduce el riesgo de introducir contaminantes en el inóculo y el medio de cultivo.
  
- Cuando se desee utilizar PPA para el sellado de los recipientes de cultivo, se debe tener en cuenta que la humedad relativa en el cuarto de crecimiento esté por encima del 50% y que los explantes utilizados tengan un contenido relativamente abundante de agua en sus tejidos, con el fin de evitar la deshidratación excesiva del medio de cultivo y la posterior muerte de la plántula. Aunque este fenómeno no ocurre los periodos de enraizamiento y endurecimiento previos al trasplante.

Para acelerar el crecimiento del brote en los explantes es necesario mantener la temperatura del cuarto de crecimiento entre 27° y 29°C y un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica entre 70 y 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y 12 horas de oscuridad.

## BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Carlos. El cultivo del ñame. Bogotá: editorial TOA, 1980.

AMMIRATO, P.V. YAMS. Handbook of plant cell culture. 1980. p 327-350.

CORTES, A. y LII-LANG, L. Tissue culture propagation of yam in Puerto Rico. Puerto Rico: Journal of agriculture of University of Puerto Rico, vol. 67, 1983. p 419-428.

DOODS, John y ROBERTS, Lorin. Experiments in plant tissue culture. New York, USA: Cambridge University Press. 1984.

FUJIWARA, K. y KOZAI, T. Control of environmental factor for plantlet production. Japan: Chiba University, symp. Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures, 1993. p 15.

HARTMANN, H y KESTER, D. Propagación de plantas. México: Continental S.A de C.V, 1992. p 549-583.

IWANANI, Y, et all. Effects of supplemental red and FAR-RED lighting using light emitting diodes on stem elongation and growth of potato plantlets in vitro. Japan: Chiba University, symp. Transplant production system. 1992. p 183.

KOZAI, T y FUJIWARA, K. Environmental effect and environmental control in plant tissue culture in vitro. Japan: Matsudo University, Cell. Dev. Biol. Faculty of horticulture. 1992. p 84.

LAUZER, D. et all. In vitro propagation and cytology of wild yams, *D. abyssinica* Hach and *D. mangenotiana* Miege. Nethrlands: Plant cell, Tissue and organ culture. 1991. p 215-223.

MALAURIE, B. Effect of grow regulators concentrations on morphological development of meristem-tips in *D. cayenensis*, *D. rotundata* and *D.*



*praehensilis*. Netherlands: Plant cell, Tissue and organ culture. 1995. p 229-235.

MANTELL, S. H, et all. A rapid propagation system for yam. Journal of horticulture science. 1979. p 3-19.

----- Apical meristem tip culture for eradication of flexuous rod viruses in yams *D. alata*. ST Augustine, Trinidad: Tropical pest management. 1980. p 170-179.

MURAI, Y, et all. Culture medium volume as a factor affecting changes with time in concentrations of medium components and growth of plantlets in vitro. Japan: symp. Transplant production system. 1992. p 139.

NAGASAWA, A. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of Chinese yam *D. opposita* Thumb. Ireland: Plant science. 1988. p 263-271.

OSORIO, J y RAMIREZ, E. Principales enfermedades del ñame en la región Caribe colombiana. Colombia: ICA informa. 1989. p 13-19.

PEREA, M. et all. Aumento en la proliferación de brotes a partir de segmentos nodales de ñame *D. alata* mediante el empleo de thiadizuron y Bencil-aminopurina. Bogotá: Programa regional para la producción de semilla de ñame libre de patógenos, vol. 1. No. 1. 1998. p 3-4.

PIERIK, R. L. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid, 1990. p 15, 34.

ROCA, W. y MROGINSKI. Cultivo de tejidos en la agricultura. Cali: CIAT, 1991, p 20-30.

SHOU, Y. In vitro tuberization in white yam *D. rotundata* Poir. Netherlands: Plant cell. Tissue and organ culture. 1988. p 121-128.

TRUJILLO, R. Ph. D. Ciencias biológicas. Comunicación personal. Cuba: Universidad Ciego de Avila. 1997.

TWIFORD, C y MANTELL, S. Production of somaticembryos and plantlets from root cells of the greater yam. Netherlands: Plant cell. Tissue and organ culture. p 17-26.

URPA. Matriz cuantitativa anual del cultivo del ñame. Sincelejo: Unidad Rural de Planificación Agropecuaria. 1997-1988. 15 p.

# ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis de varianza para la desinfección.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					5%	1%
<b>Total</b>	39	0.825				
<b>Bloque</b>	9	0.160	0.017	1.41	2.25	3.14
<b>Tratamiento</b>	3	0.325	0.108	9	2.96	4.6
<b>Error</b>	27	0.340	0.012			

**Anexo 2.** Prueba de Duncan para la desinfección.

Tratamientos	X Tratamientos	Orden ranqueado
<b>B</b>	1.0	<b>I</b>
<b>D</b>	1.0	<b>I</b>
<b>C</b>	0.85	<b>II</b>
<b>A</b>	0.80	<b>III</b>

**Anexo 3.** Análisis de varianza para el establecimiento de explantes. Combinación hormonal

ANA-KIN.

Fuente de variación	gl	SC	CM	<i>F</i> observado	<i>F</i> requerido	
					5%	1%
<b>Total</b>	119	6.25				
<b>Bloque</b>	9	0.23	0.026	0.74	1.97	2.59
<b>Tratamiento</b>	11	2.47	0.224	6.4	1.88	2.43
<b>Error</b>	99	0.34	0.035			

**Anexo4.** Prueba de Duncan para el establecimiento de explantes. Combinación hormonal ANA-KIN.

Tratamientos	X Tratamientos	Orden ranqueado
<b>T8</b>	0.95	<b>I</b>
<b>T3</b>	0.92	<b>II</b>
<b>T4</b>	0.92	<b>II</b>
<b>T7</b>	0.87	<b>III</b>
<b>T1</b>	0.85	<b>IV</b>
<b>T6</b>	0.85	<b>IV</b>
<b>T12</b>	0.82	<b>V</b>
<b>T2</b>	0.77	<b>VI</b>
<b>T11</b>	0.72	<b>VII</b>
<b>T5</b>	0.7	<b>VIII</b>
<b>T10</b>	0.6	<b>IX</b>
<b>T9</b>	0.47	<b>X</b>

**Anexo 5.** Análisis de varianza para el establecimiento de explantes. Combinación hormonal ANA-BAP.

Fuente de variación	gl	SC	CM	<i>F</i> observado	<i>F</i> requerido	
					5%	1%
<b>Total</b>	119	1.34				
<b>Bloque</b>	9	0.19	0.022	1.17	1.97	2.59
<b>Tratamiento</b>	11	0.84	0.076	4.07	1.88	2.43
<b>Error</b>	99	0.30	0.018			

**Anexo 6.** Prueba de Duncan para el establecimiento de explantes. Combinación hormonal ANA-BAP.

Tratamientos	X Tratamientos	Orden ranqueado
<b>T8</b>	0.97	<b>I</b>
<b>T7</b>	0.9	<b>II</b>
<b>T4</b>	0.87	<b>III</b>
<b>T1</b>	0.85	<b>IV</b>
<b>T2</b>	0.82	<b>V</b>
<b>T3</b>	0.82	<b>V</b>
<b>T12</b>	0.82	<b>V</b>
<b>T6</b>	0.8	<b>VI</b>
<b>T11</b>	0.77	<b>VII</b>
<b>T5</b>	0.75	<b>VIII</b>
<b>T10</b>	0.7	<b>IX</b>
<b>T9</b>	0.65	<b>X</b>

**Anexo 7.** Análisis de varianza para la multiplicación de brotes. Promedio de nudos por brote. Combinación ANA-KIN.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					5%	1%
<b>Total</b>	119	252.37				
<b>Bloque</b>	9	0.96	0.1	0.76	1.97	2.59
<b>Tratamiento</b>	11	237.5	21.59	154.21	1.88	2.43
<b>Error</b>	99	13.9	0.14			

**Anexo 8.** Prueba de Duncan para la multiplicación de brotes. Promedio de nudos por brote. Combinación hormonal ANA-KIN.

Tratamientos	X Tratamientos	Orden ranqueado
<b>T8</b>	5.75	<b>I</b>
<b>T7</b>	4.75	<b>II</b>
<b>T6</b>	3.25	<b>III</b>
<b>T5</b>	2.75	<b>IV</b>
<b>T12</b>	2.5	<b>V</b>
<b>T1</b>	2.25	<b>VI</b>
<b>T11</b>	2.25	<b>VI</b>
<b>T2</b>	1.5	<b>VII</b>
<b>T10</b>	1.5	<b>VII</b>
<b>T3</b>	1.25	<b>VIII</b>
<b>T4</b>	1.25	<b>VIII</b>
<b>T9</b>	1	<b>IX</b>



**Anexo 9.** Promedio de brotes por nudo, agrupados en bloques y por tratamientos.

Combinación hormonal ANA-KIN . Etapa de multiplicación.

Tratamiento	Bloques										Tratamiento	
	I	II	III	IV	V	IV	VII	VIII	IX	X	Tt	Xt
T1	1.25	1.25	1.5	1.75	1	1	1	1.25	1.25	1.25	12.5	1.25
T2	1	1	1	1	1.25	1.5	1.75	1.75	1.25	1	12.5	1.25
T3	1.5	1.5	1.5	2	2	2	1	1	1	1.5	15	1.5
T4	1.5	1.5	1.75	2	2	2	2	1.75	1.75	1.25	17.5	1.75
T5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
T6	1	1	1	1.25	1.25	1	1.5	1.5	1.5	1.5	12.5	1.25
T7	1.25	1	1.5	1.5	1.25	1	1.25	1.25	1.5	1	12.5	1.25
T8	2	2	1.75	1.5	1.5	1.5	1.75	1.75	1.75	2	17.5	1.75
T9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
T10	1	1.25	1.25	1.25	1.5	1.5	1	1	1.5	1.25	12.5	1.25
T11	1.25	1	1	1	1	1	1	1.5	2	1.75	12.5	1.25
T12	1.5	1.5	1.5	1.5	1	1	2	2	1.5	1.5	15	1.5
Tb	15.25	15	15.75	16.75	15.75	15.5	16.25	16.75	17	16	160	
Xb	1.27	1.25	1.31	1.39	1.31	1.29	1.35	1.39	1.41	1.33	1.33	

**Anexo 10** Análisis de varianza para la multiplicación de brotes. Promedio de brotes por nudo.

Combinación ANA-KIN.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					5%	1%
Total	119	252.37				
Bloque	9	0.96	0.1	0.76	1.97	2.59
Tratamiento	11	237.5	21.59	154.21	1.88	2.43
Error	99	13.9	0.14			

**Anexo 11.** Prueba de Duncan para la multiplicación de brotes. Promedio de brotes por nudo.

Combinación hormonal ANA-KIN.

<b>Tratamientos</b>	<b>X Tratamientos</b>	<b>Orden ranqueado</b>
T4	1.75	I
T8	1.75	I
T3	1.5	II
T12	1.5	II
T1	1.25	III
T2	1.25	III
T6	1.25	III
T7	1.25	III
T10	1.25	III
T11	1.25	III
T5	1	IV
T9	1	IV

**Anexo 12.** Promedio de nudos por brote en la multiplicación, agrupados en bloques y por tratamientos. Combinación hormonal ANA-BAP.

Tratamiento	Bloques										Tratamiento	
	I	II	III	IV	V	IV	VII	VIII	IX	X	Tt	Xt
T1	2.5	2	3	2.5	2.5	3	3	2	2	2.5	25	2.5
T2	2.25	2	2.5	2	2	2.5	2.5	2.25	2.25	2.25	22.5	2.25
T3	2	1.5	3	1.5	1.5	3	3	2	1	1.5	20	2
T4	1	1.5	2	3	1.5	1.5	3	3	2	1.5	20	2
T5	2.75	3	2.5	2.5	3	3	2.75	2.75	2.75	2.5	27.5	2.75
T6	2.5	2	2	3	3	2.5	2.5	3	2	2.5	25	2.5
T7	2.25	2.25	2.25	2.5	2.5	2	2	2.5	2	2.25	22.5	2.25
T8	1.5	2	3	3	1.5	1.5	3	2	1.5	1	20	2
T9	1.5	1	2	1	1	2	2	1.5	1	2	15	1.5
T10	2	2.5	2.75	2	2	2	2.5	2.25	2.25	2.25	22.5	2.25
T11	2.75	3	3	2.5	2.5	2.5	3	2.75	3	2.5	27.5	2.75
T12	2.5	3	2.75	3	2.5	2.5	2.5	3	3	2.75	27.5	2.75
Tb	25.5	25.75	30.75	28.5	25.5	28	31.75	29	24.75	25.5	275	
Xb	2.12	2.14	2.56	2.37	2.12	2.33	2.64	2.41	2.06	2.12	2.29	

**Anexo 13.** Análisis de varianza para la multiplicación de brotes. Promedio de nudos por brotes. Combinación ANA-BAP.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					5%	1%
Total	119	38,80				
Bloque	9	4,57	0,507	2,77	1.97	2.59
Tratamiento	11	16,05	1,459	7,97	1.88	2.43
Error	99	18,18	0.183			

**Anexo 14.** Prueba de Duncan para la multiplicación de brotes. Promedio de nudos por brote.

Combinación hormonal ANA-BAP.

<b>Tratamientos</b>	<b>X Tratamientos</b>	<b>Orden ranqueado</b>
T5	2,75	I
T11	2,75	I
T12	2,75	I
T1	2,5	II
T6	2,5	II
T2	2.25	III
T7	2,25	III
T10	2,25	III
T3	2	IV
T4	2	IV
T8	2	IV
T9	1,5	V

**Anexo 15.** Promedio de brotes por nudo en la multiplicación, agrupados en bloques y por tratamientos. Combinación hormonal ANA-BAP.

Tratamiento	Bloques										Tratamiento	
	I	II	III	IV	V	IV	VII	VIII	IX	X	Tt	Xt
T1	1.25	2	1	1	1.5	1	1.25	1.25	1.25	1	12.5	1.25
T2	1.5	1.5	2	1	1.5	2	1.75	1.5	1	1.25	15	1.5
T3	3	3.5	3.25	3.25	3.25	3	3	3.5	3.25	3.5	32.5	3.25
T4	4.5	4	5	4.5	4.25	5	4.5	4.5	4.75	4	45	4.5
T5	1.5	1.25	1	1.25	1.25	1	1.25	1.5	1.25	1.25	12.5	1.25
T6	1.75	1.75	1.5	2	2	1.75	1.5	1.75	1.75	1.75	17.5	1.75
T7	2.5	3	3	2	2.5	2.5	2	2	3	2.5	25	2.5
T8	4.5	5	4.75	4.75	4.75	4.5	4.5	5	5	4.75	47.5	4.75
T9	1	1	0.5	0.5	1	1	1	1	2	1	10	1
T10	2	1.5	1.25	1.25	1	1	1.25	1.5	1.5	1.25	12.5	1.25
T11	1.25	1	1	1	1.25	1.25	1.5	1.25	1.5	1.5	12.5	1.25
T12	1.5	1.5	1.5	1	1	2	1.5	2	1.75	1.25	15	1.5
Tb	25.25	27	25.75	23.5	25.25	26	25	26.75	28	25	257,5	
Xb	2.1	2.25	2.14	1.95	2.1	2.16	2.08	2.22	2.33	2.08	2.14	

**Anexo 16.** Análisis de varianza para la multiplicación de brotes. Promedio de brotes por nudo. Combinación ANA-BAP.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					5%	1%
Total	119	201,07				
Bloque	9	1.2	0,13	1.63	1.97	2.59
Tratamiento	11	191,82	17,43	214,58	1.88	2.43
Error	99	8,04	0.08			

**Anexo 17.** Prueba de Duncan para la multiplicación de brotes. Promedio de brotes por nudo.

Combinación hormonal ANA-BAP.

Tratamientos	X Tratamientos	Orden ranqueado
T8	4,75	I
T4	4,5	II
T3	3,25	III
T7	2,5	IV
T6	1,75	V
T12	1,5	VI
T2	1,5	VI
T11	1,25	VII
T10	1,25	VII
T5	1,25	VII
T1	1,25	VII
T9	1	VIII

**Anexo 18.** Análisis de varianza para el enraizamiento de plántulas. Tratamiento hormonal con

ANA.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					5%	1%
<b>Total</b>	39	42,21				
<b>Bloque</b>	9	0,68	0,076	1,953	2,25	3,14
<b>Tratamiento</b>	3	40,46	13,489	344,98	2,96	4,60
<b>Error</b>	27	1,05	0,039			

**Anexo 19.** Prueba de Duncan para el enraizamiento. Promedio de raíces por planta.

Tratamientos hormonales con ANA.

Tratamientos	X Tratamientos	Orden ranqueado
T4	4,25	I
T3	4	II
T2	2,75	III
T1	1,75	IV

**ANEXO 20. Arreglo de bloques completos al azar.**

**Etapas de desinfección.**

Bloques									
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
A	D	B	C	A	B	D	C	A	B
B	C	A	D	C	D	B	A	D	C
C	B	D	B	D	A	C	D	B	A
D	A	C	A	B	C	A	B	C	D

Tratamientos A-D.

**Etapas de establecimiento y multiplicación.**

Bloques									
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
1	2	3	4	3	2	1	3	4	2
3	4	2	1	4	3	2	1	3	4
2	1	4	3	2	1	4	2	1	3
4	3	1	2	1	4	3	4	2	1

Tratamientos 1-4.

Bloques									
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
5	6	7	8	7	6	5	7	8	6
7	8	6	5	8	7	6	5	7	8
6	5	8	7	6	5	8	6	5	7
8	7	5	6	5	8	7	8	6	5

Tratamientos 5-8.

Bloques									
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
9	10	11	12	11	10	9	11	12	10
11	12	10	9	12	11	10	9	11	12
10	9	12	11	10	9	12	10	9	11
12	11	9	10	9	12	11	12	10	9

Tratamientos 9-12.

### **Etapa de enraizamiento.**

Bloques									
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
1	4	2	3	1	2	4	3	1	2
2	3	1	4	3	4	2	1	4	3
3	2	4	2	4	1	3	4	2	1
4	1	3	1	2	3	1	2	3	4



**ANEXO 21. Cálculo estadístico para el diseño de bloques completos al azar .**

**Término de corrección:**

$$C = (\sum X)^2 / r.n$$

Donde r = número de repeticiones y n = número de tratamientos.

**Suma de cuadrados del bloque.**

$$SCB = (\sum (Tb)^2 / n) - C$$

**Cuadrado medio del bloque.**

$$CMB = SCB/gl(b)$$

**Suma de cuadrados del tratamiento.**

$$SCT = (\sum (Tt)^2 / r) - C$$

**Cuadrado medio del tratamiento.**

$$CMT = SCT/gl(t)$$

**Suma de cuadrados totales.**

$$SC = \sum (X^2) - C$$

**Suma de cuadrados del error.**

$$SCE = SC - SCT - SCB$$

**Cuadrado medio del error.**

$$CME = SCE/g_l(e)$$

**Valores F observados.**

$$F(\text{bloques}) = CMB/CME$$

$$F(\text{tratamientos}) = CMT/CME$$

**Prueba del rango múltiple de Duncan.**

$$DSM_{0,05} = t \cdot 2.S^2/r$$

$$DSM_n = R(DSM)$$

**ANEXO 22. Componentes esenciales del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas.**

Componentes	Cantidad en mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Glicina-HCl	2,0
Tiamina-HCl	0,10
Piridoxina-HCl	0,50
Acido Nicotínico	0,50
Mioinositol	100,0
Sacarosa	30,0 gr
pH	5,8-6

Tomado de Mroginski y Roca, 1991.

**ANEXO 23. Relación entre la temperatura y el tiempo de germinación de los explantes.**

