

**Efecto de tres concentraciones de bencil
aminopurina en multiplicación *in vitro* de
yuca – genotipo CM 6119-3 –**

Leonel Eduardo Orellana Urrutia

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Efecto de tres concentraciones de bencil
aminopurina en multiplicación *in vitro* de
yuca – genotipo CM 6119-3 –**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Leonel Eduardo Orellana Urrutia

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2013

Efecto de tres concentraciones de bencil aminopurina en multiplicación *in vitro* de yuca – genotipo CM 6119-3 –

Presentado por:

Leonel Eduardo Orellana Urrutia

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora principal

Renán Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Dennis Ramírez, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto de tres concentraciones de bencil aminopurina en multiplicación *in vitro* de yuca – genotipo CM 6119-3 –

Leonel Eduardo Orellana Urrutia

Resumen: La yuca (*Manihot esculenta* C.) es una planta arbustiva, perenne de la familia Euphorbiaceae, originaria de América del Sur y es cultivada actualmente de forma extensiva en zonas de trópico y sub-trópico, es de gran importancia por ser un producto de consumo común, fuente económica de energía y nutritiva. El cultivo de yuca puede ser una gran alternativa para los productores por ser de alta rentabilidad. La propagación convencional puede permitir la entrada de agentes patógenos sistémicos al material, el cultivo de tejidos es otra forma de propagar y cultivar la yuca, que garantiza que los productores puedan acceder a material de siembra libre de enfermedades. En este estudio se busca evaluar la respuesta de los microesquejes a tres concentraciones de 6-Bencil Aminopurina (BAP) para la multiplicación por cultivos de un solo nudo, esta respuesta será medida por el número de segmentos nodales producidos por microesqueje. Los microesquejes utilizados en este experimento fueron obtenidos del establecimiento de domos meristemáticos provenientes de yemas axilares. La etapa de multiplicación *in vitro* de yuca permitió observar el desarrollo de segmentos nodales y raíces, siendo la concentración de 0.04 mg/L de BAP la que logró la mejor respuesta para la multiplicación *in vitro* de microesquejes de yuca genotipo CM 6119-3, mientras que en altas concentraciones (3.00 y 4.00 mg/L) el desarrollo de segmentos nodales fue muy bajo y forman callo casi en su totalidad.

Palabras clave: Citocininas, cultivo de tejidos, fitohormona, *Manihot esculenta* Crantz, micropropagación.

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta* C.) is a bushy plant, perennial from the family Euphorbiaceae, originally from South America and is cultivated in extensive way in tropical and subtropical zones, it has great importance for being a common consumer product, economical source of energy and nutritive. The cultivation of cassava can be a great alternative for producers for being highly profitable. The conventional propagation can allow entry of systemic pathogens to the material, the tissue culture *in vitro* is another way to propagate and cultivate cassava, which ensures that producers can have access to material free of diseases. This study seeks to evaluate the response of microcuttings to three concentrations of 6-Benzyl Aminopurine (BAP). The stage of multiplication *in vitro* of cassava allowed us to observe the development of nodal segments and roots, being the concentration of 0.04 mg/L of BAP that achieved the best answer for the *in vitro* multiplication of microcuttings of cassava genotype CM 6119-3, whereas at high concentrations (3.00 y 4.00 mg/L) the development of nodal segments was very low and formed callus almost entirely.

Keywords: Cytokinin, *Manihot esculenta* Crantz, micropropagation, plant hormone, plant tissue culture.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4 CONCLUSIÓN.....	9
5 RECOMENDACIONES.....	10
6 LITERATURA CITADA.....	11
7 ANEXOS	13

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1. Medio de cultivo basal Murashigue y Skoog (1962) modificado para establecimiento y multiplicación *in vitro* de yuca. 4
2. Efecto de las concentraciones de BAP en la formación de segmentos nodales en microesquejes de yuca a los 34 y 55 días después de la siembra. 7

Figuras Página

1. Microesquejes de yuca obtenidos de la etapa de establecimiento y utilizados para la multiplicación. 3
2. Preparación de microesquejes para multiplicación de yuca. 5
3. Respuesta de microesquejes a BAP 8

Anexos Página

1. Supervivencia y muerte por necrosis, hongos y bacterias en microesquejes de un solo nudo en etapa de multiplicación de yuca –genotipo CM 6119-3–. 13

1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* C.) es una planta arbustiva perenne de la familia Euphorbiaceae que cuenta con 7200 especies aproximadamente. Una de las características más notables de esta familia es el desarrollo de sus vasos lactíferos los cuales contienen una sustancia lechosa que proviene de células secretoras llamadas galactocitos. Es originaria de América del sur y es cultivada actualmente de forma extensiva en zonas del trópico y sub-trópico, en latitudes menores de 30° y altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 1800 m.s.n.m. (Ceballos y de la Cruz 2002).

El cultivo de yuca es de gran importancia por ser un producto de consumo común, fuente económica de energía y nutritiva, aporta unos 124 kilocalorías/100 g, su raíz es rica en potasio, calcio y vitamina C, también aporta minerales y vitaminas del complejo B, tiene un bajo contenido proteico, además de ser de gran importancia a nivel industrial. Entre los cultivos del trópico ocupa el cuarto lugar entre los mejores productos como fuente de calorías siendo antecedida únicamente por el maíz, caña de azúcar y arroz. Se considera básica en la alimentación humana y animal. Su producción se realiza en suelos marginales, siendo una planta tolerante a plagas, enfermedades y sequía (IICA-INIAP 2003).

La producción de yuca puede ser una gran alternativa para productores hondureños por ser un cultivo de alta rentabilidad, además de poseer un gran impacto económico ya que su demanda en el mercado nacional e internacional tiene un crecimiento constante (Lardizábal 2002).

Debido a que la yuca es de mucha importancia para la alimentación en los países en vías de desarrollo y su potencial de mejora mediante la propagación sexual se ve limitada por su alta heterocigosidad y la baja fertilidad natural, son la biotecnología y el cultivo de tejidos las herramientas más eficaces para su propagación masiva (Li *et al.* 1998).

El método de propagación más utilizado es el convencional, utilizando material vegetativo, también llamado cangre (estacas de 20 a 30 cm), el cual debe ser seleccionado cuidadosamente para obtener plantas vigorosas, libre de daños de insectos y enfermedades, se debe utilizar el material más grueso que se disponga tomando en cuenta que tenga de 5 a 8 yemas (Lardizábal 2002). Este método puede tener el inconveniente de que las plantas seleccionadas como madres presenten problemas sanitarios y por consiguiente deben descartarse como fuente de material vegetativo (Escobar *et al.* 2012).

El rendimiento del cultivo de yuca es afectado por enfermedades fungosas y bacterianas que dañan tanto el tejido foliar como radicular. El método recomendado para prevenir estas enfermedades es usar material de siembra sano y resistente obtenido de plantaciones sanas provenientes de cultivos de meristemas (Aristizabal y Sanchez 2007).

El tipo de propagación convencional puede permitir la entrada de patógenos sistémicos al material en el momento de cortar las estacas, como: *Diplodia manihotis* y *Xantomonas axonopodi*; y plagas como: barrenadores del tallo, escamas, huevos de insectos y ácaros (López 2002).

La técnica de cultivo de tejidos es otra forma de propagar y cultivar la yuca, que garantiza que los productores puedan acceder a material de siembra libres de enfermedades, correspondiendo al clon de la variedad que sea necesaria y obteniendo una buena producción (Escobar *et al.* 2012). Es posible utilizar material vegetativo infectado por enfermedades viróticas y obtener plantas libres de enfermedades, siempre y cuando se le dé el tratamiento térmico adecuado para dicho proceso (Roca *et al.* 1991).

En estudios previos se logró el establecimiento del cultivo utilizando domos meristemáticos y la producción de brotes utilizando los explantes en el medio de Murashige y Skoog modificado y suplementado con 0.5 mg/L de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y 40 g/L de Sacarosa (Buechsel Reyes 2012). En este estudio se busca evaluar la respuesta de los microesquejes a tres concentraciones de BAP para la multiplicación por cultivos de un solo nudo, esta respuesta será medida por el número de segmentos nodales producidos por microesqueje.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería Agronómica del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el Valle de Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Material vegetal y fuente del explante para el establecimiento. Se utilizaron meristemos axilares de *Manihot esculenta* C. del genotipo CM 6119-3, obtenidos del área experimental del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana.

Multiplicación. Para esta etapa se utilizaron los microesquejes producidos del material establecido (Figura 1).

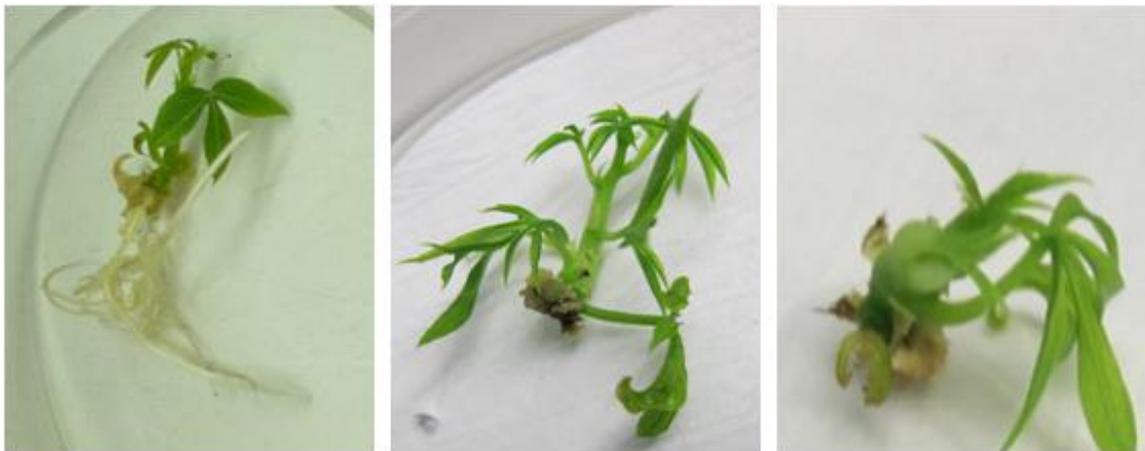


Figura 1. Microesquejes de yuca obtenidos de la etapa de establecimiento y utilizados para la multiplicación.

Preparación del medio de cultivo. Para la preparación de todas las soluciones y medio de cultivo se utilizó agua destilada, el pH del medio se ajustó a 5.8 el cual fue medido con el Meter S20 Seven Easy™. El medio fue dispensado en frascos de vidrio 20 ml por frasco. El medio fue esterilizado en autoclave Market Forge Sterilmatic STM- E a 1.05 kg/cm² y a 121°C durante 20 minutos.

Establecimiento y multiplicación. Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado y suplementado con BAP (Cuadro 1).

Cuadro 1. Medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962) modificado para establecimiento y multiplicación *in vitro* de yuca.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes Orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina- HCL	1.000
		BAP	0.040
		Ácido giberelico	0.050
		ÁNA	0.020
		Sacarosa	20,000.000
	Phytigel	1,800.000	

Fuente: Roca *et al.* (1991).

Tratamientos. Para la multiplicación el medio se suplementó con BAP (0.04, 1.00 y 3.00 mg/L) (Roca *et al.* 1991).

Preparación del material vegetal. Para la desinfección en el establecimiento se eliminaron las hojas de los explantes y se cortaron en segmentos de 1.5 cm con una yema cada uno, después se lavaron con agua y jabón, luego se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl, se usó Magia Blanca[®] al 4.72% i.a.) al 10% (v/v) con dos gotas de Tween80 por cada 100 ml durante 15 minutos, posteriormente se hizo un triple lavado con agua destilada estéril.

Desinfección de cámara de flujo laminar y herramientas. Se realizó 30 minutos antes de hacer la siembra con alcohol al 70%, las herramientas (pinzas y bisturí) fueron esterilizados en autoclave a 1.05 kg/cm^2 y 121°C durante 20 minutos y después a 250°C , en el esterilizador de calor seco Z3378550- Steri 250, AC input 120V.

Siembra del material vegetal en establecimiento. Se utilizó el procedimiento detallado por Buechsel Reyes (2012).

Multiplicación. Los microesquejes establecidos fueron llevados al cuarto de transferencia, se separaron en segmentos nodales (Figura 2), se limpiaron y fueron colocados en medio de cultivo estéril (Cuadro 1). Los frascos utilizados fueron de 25 cm de diámetro y de 8.5 cm de alto, se taparon con papel aluminio y se sellaron con plástico resinite luego fueron incubados a una temperatura de 22°C y humedad relativa de 50%. La intensidad de luz es de 2000 Lux con un fotoperiodo de 16 horas, las lámparas que se utilizan son fluorescentes del tipo Philips- twister 23W 110-127V.



Figura 2. Preparación de microesquejes para multiplicación de yuca. A) Corte de hojas. B) Separación en segmentos nodales. C) Segmentos nodales listos para siembra.

Diseño Experimental. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), teniendo tres tratamientos, con tres repeticiones y siete unidades observacionales. Se realizó un análisis de varianza ANDEVA, y una separación de medias con el método de DUNCAN con un nivel de significancia $P \leq 0.05$. Estos datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.3[®]) (SAS 2009).

Datos evaluados. Se evaluó semanalmente la respuesta de los microesquejes a las concentraciones de BAP observando sobrevivencia y contaminación. Se tomó como microesqueje muerto aquel que tenía una apariencia seca y coloración café, esta respuesta fue expresada como porcentaje. El crecimiento y desarrollo de estructuras vegetativas (segmentos nodales y raíces) fue evaluado a los 34 y 55 días y expresado en forma numérica.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microesquejes expuestos a 0.04 mg/L de BAP desarrollaron un mayor número de segmentos nodales (Cuadro 2) este resultado puede deberse a que en bajas concentraciones el BAP ayuda a la diferenciación celular y formación de yemas axilares mientras que en altas concentraciones (mayor a 1 mg/L) promueven la formación de callo (Roca *et al.* 1991).

El único tratamiento en el que los microesquejes desarrollaron raíces fue el suplementado con 0.04 mg/L de BAP, este resultado pudo deberse a que el desarrollo de raíces se ve limitado por altas concentraciones de BAP, mientras que en concentraciones menores de 0.5 mg/L de BAP se obtiene un buen desarrollo de las mismas (Marín *et al.* 2009). Según Oliveira *et al.* (2000) el desarrollar raíces puede traer beneficios para la multiplicación, ya que puede haber una mayor absorción de los nutrientes y con esto un mejor desarrollo de la parte aérea la cual servirá como material de siembra para los cultivos siguientes.

El resultado obtenido en desarrollo de segmentos y raíces fue muy parecido al estudio realizado por Álvarez y Ortega (2010) los cuales concluyeron que una combinación de 0.01 mg/L de ANA y 0.05 mg/L de BAP lograron la mejor y más apropiada respuesta de microesquejes de yuca en la multiplicación en cultivos de un solo nudo.

Cuadro 2. Efecto de las concentraciones de BAP en la formación de segmentos nodales en microesquejes de yuca a los 34 y 55 días después de la siembra.

BAP mg/L	Segmentos nodales [£]	
	34 días	55 días
0.04	2.61 ± 0.34 a	4.03 ± 0.60 a [¥]
1.00	0.06 ± 0.09 b	0.18 ± 0.14 b
3.00	0.13 ± 0.03 b	0.13 ± 0.03 b

£ Promedios y desviación estándar.

¥ Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes, según la prueba Duncan con una $P \leq 0.05$.

Los tratamientos con 1.00 y 3.00 mg/L BAP no mostraron desarrollo de raíces y se observó un alto porcentaje de microesquejes que formaron callo (Figura 3), 88 y 96% respectivamente, resultado que concuerda con el estudio de Marín *et al.* (2009) donde se mostró un desarrollo de callo de 71 a 100% en tratamientos con dosis mayores a 0.5 mg/L de BAP. Este resultado pudo haber sido provocado por la alta concentración de BAP, fitohormona de tipo citocinina que generalmente se utiliza para la división celular y producción de brotes; esta rompe la dominancia apical desacelerando el crecimiento vertical de la planta, formando segmentos más cortos y callo (Jordán y Casaretto 2006).



Figura 3. Respuesta de microesquejes a BAP. A) Desarrollo de segmentos nodales y raíces con la dosis de 0.04 mg/L, B y C) Formación de tejido callogénico con las dosis de 1.00 y 3.00 mg/L.

4. CONCLUSIÓN

La mejor respuesta de los microesquejes para la multiplicación *in vitro* de yuca genotipo CM 6119-3, se logró con la concentración de 0.04 mg/L de BAP mientras que en altas concentraciones (1 y 3 mg/L) el desarrollo de segmentos nodales fue muy bajo y formaron callo casi en su totalidad.

5. RECOMENDACIONES

- Usar la dosis de 0.04 mg/L de BAP en la multiplicación *in vitro* de yuca en cultivos de un solo nudo.
- Seguir evaluando estos medios con otras variedades y genotipos de yuca.
- Continuar la investigación en la etapa de aclimatización del genotipo CM 6119-3.

6. LITERATURA CITADA

Alvarez Benavides, D. J. y R. E. Ortega Ortega. 2001. Micropropagación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) variedad venezolana, utilizando la técnica de segmentos nodales. Tesis Biol. Universidad de Sucre, Bolivia. 168 p.

Aristizabal, J. y T. Sanchez. 2007. Guía técnica para la producción y análisis de almidón de yuca. Roma, Italia. 163: 153 p.

Buechsel Reyes, C.D. 2012. Establecimiento *in vitro* de yuca –variedad valencia– mediante domos meristemáticos y evaluación de tres medios de cultivo para la producción de brotes. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 26p.

Ceballos, H. y G. A. de la Cruz. 2002. Taxonomía y Morfología de la Yuca. *In*: B. Ospina y H. Ceballos (eds) La Yuca en el Tercer Milenio, Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p 17-33.

Escobar, R. H., E. Caicedo, L. Muñoz, A. Ríos, A. Azcárate, C. Dorado y J. Tohme. 2012. El cultivo *in vitro*: otra manera de propagar la yuca. (en línea). Consultado el 29 de junio de 2013. Disponible en:
http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/jspui/bitstream/123456789/6636/1/el_cultivo_in_vitro_otra_manaera_propagar_yuca.pdf

IICA-INIAP. 2003. Sistema de información tendiente a la producción agroecológica del cultivo de yuca (en línea). Consultado el 14 de julio de 2013. Disponible en:
http://www.ecuarural.gov.ec/ecuagro/paginas/PRODUCTOS/WEB_ULPI/Manual_Yuca/Manual_%20yuca.htm#yucaun.

Jordán M. y J. Casaretto. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *In*: F.A. Squeo, y L. Cardemil (eds) Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. p 1-28.

Lardizábal, R. 2002. Manual de producción de Yuca Valencia. (en línea). Consultado 2 de julio de 2013. Disponible en:
http://www.fintrac.com/docs/honduras/29_%20yuca_manual_de_produccion_06_02.pdf

Li, H. Q., J. Y. Guo, Y. W. Huang, C.Y. Liang, H. X. Liu, I. Potrykus y J. Puntieri Kaerlas. 1998. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 410-414.

López, J. 2002. Semilla Vegetativa de Yuca. *In*: B. Ospina y H. Ceballos (eds) *La Yuca en el Tercer Milenio, Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p. 49-75.

Marín, A., J. G. Albarrán, F. Fuenmayor y D. Perdomo 2009. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de cinco cultivares élites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *UDO Agrícola*. 9 (3): 556-562.

Oliveira, R. P., T. Da Silva Gomes y A. D. Vilarinhos. 2000. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35 (12): 2329-2334.

Roca, W. M., B. Nolt, G. Mafla, J. Roa y R. Reyes. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *In*: W. M. Roca y L. A. Morinski (eds) *Aplicaciones de Cultivo de Tejidos a Especies Vegetales Económicamente Importantes*. Unidad de investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p 404-420.

SAS. 2009. SAS User guide. Statistical Analysis Institute Inc. Cary N.C.

7. ANEXOS

Anexo 1. Supervivencia y muerte por necrosis, hongos y bacterias en microesquejes de un solo nudo en etapa de multiplicación de yuca –genotipo CM 6119-3–.

Microesquejes	Cantidad	%
Vivos	86	91.5
Muerte por necrosis	7	7.4
Muerte por hongos	1	1.1
Muerte por bacterias	0	0.0
Total	94	100.0