

**ESTANDARIZACION DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PROPAGACION *IN VITRO* A PARTIR DE MERISTEMOS DE WATSIMBA**

***Tigridia pavonia* Ker Gawl**

**STANDARIZATION OF A CULTURE MEDIUM TO THE PROPAGATION IN
VITRO FROM WATSIMBA MERISTEMS *Tigridia pavonia* Ker Gawl**

Alvaro Guillermo Caicedo L.¹

Gloria Cristina Luna C.²

Germán Chaves J.³

RESUMEN

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales adscrito a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño, se estudió la capacidad de regeneración de explantes de Watsimba *Tigridia pavonia* Ker Gawl a la adición de dos reguladores hormonales, ANA (Ácido naftalenacético) como auxina y CIN (6 furfuril amino purina) como citoquinina, a diferentes concentraciones, bajo condiciones *in vitro*; esta investigación tuvo como objetivos estandarizar un protocolo y un medio de cultivo para la propagación *in vitro* de Watsimba. Se utilizó un diseño DIA con tres tratamientos hormonales, más el testigo que correspondió al medio básico sin hormonas. Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones, para un total de 80 unidades experimentales, donde se evaluaron variables como: porcentaje de contaminación, porcentaje de mortalidad y porcentaje de prendimiento. El análisis de varianza, indicó que no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Palabras clave: *Tigridia pavonia* Ker Gawl, reguladores hormonales, *in vitro*.

¹ Estudiante Tesista. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Ingeniería Agronómica. e-mail: alcalagos@hotmail.com

² I. A., M.Sc. Docente. Facultad de Ciencias Agrícolas. Directora Grupo PIFIL. Universidad de Nariño.

³ I.A., Esp. Docente. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño.

ABSTRACT

In the Plant Tissue Cultures Laboratory attached to the Agricultural Sciences Faculty of the University of Nariño, the regeneration capacity of Watsimba *Tigridia pavonia* Ker Gawl explants was studied to the addition of two hormonal regulators, NAA (naphthaleneacetic acid) as auxin and CAS (6 furfurylaminopurine) as cytokinin, at different concentrations and under *in vitro* conditions; this research aimed at standardize a protocol and a culture medium to the propagation *in vitro* of Watsimba. Random irrestrict design was used with three hormone treatments, and the control was the basic medium without hormones. Each treatment had 20 repetitions, for a total of 80 experimental units, where variables as: contamination percentage, death rate and sprouting percentage were evaluated. The analysis of variance indicated no significant difference between treatments.

Key words: *Tigridia pavonia* Ker Gawl, hormonal regulators, *in vitro*.

INTRODUCCION

La Watsimba *Tigridia pavonia* Ker Gawl es una planta silvestre herbácea. A nivel mundial, es reconocida únicamente por sus características ornamentales; en Colombia, en el Municipio de Sibundoy – Putumayo, se encuentra en el área marginal sin que tenga un manejo técnico adecuado. Puede ser utilizada a nivel alimenticio (flor y bulbo), medicinal y ornamental. La flor es utilizada en la elaboración de mermeladas y dulces. El bulbo, rico en almidón se transforma en harina para la preparación de diferentes productos tales como coladas, galletas, pan etc. Además, se puede emplear para tratar enfermedades como bronquitis, asma, tos y gripe en forma de jarabes y en dolencias circulatorias, con el extracto que se obtiene de las flores. La flor tiene unas bellas características que la convierten en planta llamativa en algunos jardines (De Villota, 2005).

Su tallo es subterráneo, presenta un bulbo carnoso de contextura blanda. Las hojas son largas, plegadas y terminan en punta, miden entre 40-50 cm de largo por 1- 2.5 cm de ancho. Sus flores son sésiles y de variados colores, generalmente miden de 9 a 10 cm de diámetro, se encuentran formadas por 3 o 4 pétalos externos grandes, cóncavos y 3

internos con manchas multicolores en el cáliz lo que les da un aspecto atigrado; el pistilo mide aproximadamente 5 cm y sobresale de los pétalos (Paguatian, 2007).

La planta requiere semi-sombra, además de un suelo con buen drenaje, crece en lugares húmedos y posee dos formas de reproducción, sexual por medio de semilla y asexual por medio del bulbo. Por medio de semillas, la *Tigridia pavonia* Ker Gawl tarda unos 30-90 días en germinar (Instituto Nacional de Ecología, 2005). A partir de bulbos la Watsimba tardó en emerger 43 días según observaciones de Botina y Bravo (2009).

Actualmente las experiencias que se han llevado a cabo en cuanto a la germinación de Watsimba son muy escasas y empíricas ya que las únicas vivencias reconocidas son los reportes de los indígenas y las adelantadas por el grupo de investigación “Los exploradores” de la Escuela Normal Superior de Sibundoy – Putumayo, quienes dieron a conocer las bondades que posee esta especie promisoría, cualidades que hacen de ella, una planta altamente competitiva en el mercado (De Villota, 2005).

El cultivo de tejidos *in vitro*, es una poderosa herramienta que permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos (Jiménez, 1998b).

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Generalmente, se emplean plantas sanas y vigorosas y dentro de éstas, las zonas que se encuentran en activa división, como los meristemas (Roca y Mroginski, 1991).

El medio de cultivo sintético le debe propiciar al explante los requerimientos nutricionales esenciales en proporción y dosis específicas. Su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos, como del pH del medio, del agente solidificante y de las condiciones ambientales y controladas que se le brinde al explante (Margara, 1988). La fórmula de Murashige y Skoog (62), ha demostrado ser el medio adecuado para una

gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta (Hurtado y Merino, 1987).

Los reguladores de crecimiento en pequeñas cantidades aumentan, inhiben o modifican de una u otra forma cualquier proceso fisiológico del vegetal. Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas es necesario para formar plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante. Se considera que si la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo favorece a la segunda, se induce la formación de brotes y lo contrario promueve el enraizamiento y la callogénesis (Pérez, 1994).

Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de cultivo es generalizada, se utilizan concentraciones que oscilan entre 0.03-30 ppm. Al contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemos, son los lugares de síntesis, se adicionan al medio a concentraciones que oscilan entre 0.01 - 10 ppm (Jiménez, 1998a).

Para el desarrollo del cultivo *in vitro*, cualquier órgano o tejido puede ser utilizado como fuente de explante; sin embargo, el grado de éxito obtenido dependerá de la selección que se haga del mismo (Capote y Perez, 1997).

Este proyecto hace parte de la Línea de Investigación de Especies Promisorias del Grupo PIFIL, adscrito a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño, el cual ha venido realizando trabajos que contribuyen con el desarrollo sostenible del sector agrícola. El objetivo de este estudio fue aportar al conocimiento de la propagación de *Watsimba* en condiciones *in vitro*, estandarizando un protocolo y un medio de cultivo para su propagación, observando la capacidad de regeneración que tienen los explantes a la adición de diferentes relaciones hormonales al medio de cultivo.

MATERIALES Y METODOS

Localización. El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, adscrito a la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad de Nariño, en la ciudad de Pasto, localizado a una altura de 2.540 msnm, presentando condiciones ambientales como: 25 °C de temperatura promedio interna, 75% de humedad relativa y 2.000 lux de intensidad lumínica (sala de incubación).

Diseño experimental. Se utilizó un diseño DIA con tres tratamientos hormonales, más testigo, el cual fue el medio básico sin hormonas. Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones, donde cada unidad experimental correspondió a un contenedor, en el cual se sembró el explante que para este caso fue un meristemo; los cuatro tratamientos originaron un total de 80 unidades experimentales. Los tratamientos fueron los siguientes:

T₀: 0 ppm de ANA y 0 ppm de CIN.

T₁: 0.05 ppm de ANA y 2 ppm de CIN.

T₂: 0.04 ppm de ANA y 1 ppm de CIN.

T₃: 0.03 ppm de ANA y 0.5 ppm de CIN.

VARIABLES EVALUADAS

- ❖ **Porcentaje de contaminación:** a partir del quinto día y cada cinco días después de sembrarse las unidades experimentales, se realizó una evaluación visual del porcentaje de contaminación de los explantes o del medio.
- ❖ **Porcentaje de mortalidad:** a partir del quinto día y cada cinco días se realizó una evaluación visual en todas y cada una de las unidades experimentales, observando el número de explantes que presentaron necrosamiento del tejido.
- ❖ **Porcentaje de prendimiento:** a partir del quinto día y cada cinco días se realizó evaluaciones visuales del prendimiento en todas y cada una de las unidades experimentales, observando el número de explantes que presentaron una

coloración verde, aspecto que se tomó como parámetro para determinar el prendimiento.

Análisis de la Información

Los resultados obtenidos se sometieron al análisis de varianza y pruebas de Duncan para la comparación de promedios.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Análisis de Varianza presentado en la Tabla 1 se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos y en todas las variables evaluadas.

Tabla 1. Análisis de Varianza para las variables Contaminación, Mortalidad y Prendimiento de explantes de Watsimba (*Tigridia pavonia* Ker Gawl)

F de V	GL	CONTAMINACION	MORTALIDAD	PRENDIMIENTO
		CM	CM	CM
TRAT	3	0,012NS	0,007NS	0,007NS
ERROR	12	0,181	0,109	0,109

Las respuestas expresadas por los explantes de Watsimba, no presentaron significancia, posiblemente debido a que esta especie es una planta que no ha sido estudiada a profundidad, razón por la cual carece de información científica que permita conocer ampliamente sus características, su comportamiento a nivel de laboratorio y la metodología que se debe seguir en una investigación que requiera de una meticulosa manipulación en el establecimiento de los ensayos a evaluar.

Contaminación

Fernández y Zapata (1999), en su estudio micropropagación de plantas de *Mentha piperita* aportan que al lavar los explantes con abundante agua destilada y hacer la desinfección con etanol (70%) por 5 minutos más hipoclorito de sodio (5.25%) con un tensoactivo (Tween 20 al 0.01%) por un tiempo de 5 minutos y finalizando con tres enjuagues con agua destilada estéril obtuvieron 9% de contaminación para tallos y 90%

para hojas; además, afirman que al realizar la descontaminación, en muchos casos se presento destrucción del explante y daño físico en el material foliar.

La manipulación de Watsimba que se llevó a cabo en el laboratorio permitió determinar que la estructura del bulbo y su parte central son de una contextura extremadamente blanda y delicada, posiblemente al realizar la desinfección del material vegetal y al efectuar los cortes en la siembra se causó algún daño físico que limitó al explante para que continuara con su desarrollo.

Por otra parte De La Barrera (2003), al evaluar un medio de cultivo para la propagación *in vitro* del Laurel de cera, concluyó que el mejor método de desinfección es utilizando hipoclorito de sodio al 2.5% durante 20 minutos y una solución concentrada de yodo bactericida – fungicida al 0.15% durante 5 minutos.

Calle y Torres (1996), al propagar pino bajo condiciones *in vitro* obtuvieron 95% de explantes sin contaminación utilizando el siguiente protocolo de desinfección: Tween 20 por 3 minutos, enjuague con agua destilada estéril, hipoclorito de sodio al 0.5% por 1 minuto y tres enjuagues con agua destilada estéril.

En la propagación *in vitro* de Watsimba por medio de meristemos, se necesita eliminar gran parte de los catáfilos del bulbo con el fin de permitir que los agentes desinfectantes penetren al área que se desea utilizar como material de siembra, se puede afirmar que este proceso no fue efectivo en la desinfección; además, se desconoce si esta especie es portadora de patógenos en el bulbo, lo que posiblemente amerite la utilización de un producto bactericida – fungicida que actúe como otro factor desinfectante aparte del hipoclorito de sodio (5%) y etanol (70%) utilizados en la esterilización de la estructura vegetal.

Mortalidad

De La Barrera (2003), aporta que cuando realizó la siembra de los explantes de Laurel de cera estos presentaron oscurecimiento de tejido en forma inmediata, es decir a las

pocas horas de haberse realizado la siembra. Además, afirma que la aplicación del antioxidante ácido cítrico – ascórbico no pudo controlar efectivamente la oxidación y aquellos meristemos que pudieron mantenerse hasta llegar a la etapa de formación de callo no lograron completar un desarrollo normal en su crecimiento presentando síntomas manifestados con pigmentos de color castaño provocando el necrosamiento del tejido.

Esto es posible explicarlo de acuerdo a López (1993), quien aporta que cuando se produce la oxidación, ésta se manifiesta mediante la exudación de pigmentos de color castaño o negro, fenómeno que se debe usualmente a la acción de polifenoles y taninos, cuya emisión se libera como consecuencia de los brotes, y que a la vez conducen a la formación de quinonas altamente tóxicas, lo que conlleva a una pérdida de clorofila, oscurecimiento de los tejidos y descenso de su capacidad organogénica, produciéndose finalmente la muerte del explante.

Se puede afirmar que la mortalidad que se obtuvo fue una consecuencia de la alta tasa de contaminación que se presentó en el establecimiento del ensayo. Además, es posible que los explantes necesiten de un tratamiento antioxidante por medio del cual se evite los procesos de oxidación que conllevan a la muerte del tejido.

Prendimiento

Capote y Perez (1997), obtuvieron significancia en su estudio de la capacidad organogenética de diferentes explantes de cebolla al presentar el 43% de regeneración de plantas y concluyeron que al evaluar diferentes concentraciones de reguladores hormonales las más efectivas en formar plantas a partir de meristemos fueron la adición de ANA y CIN a una relación de 0.05 y 2 ppm respectivamente.

Por otra parte Capote, *et al* (2000), evaluaron la variabilidad en cebolla y al analizar la respuesta en el crecimiento según la composición de los diferentes reguladores en los medios de cultivo, encontraron que la adición de CIN a concentraciones altas (2 y 5 ppm/L), en combinación con 2,4-D a una concentración muy baja (0,01 ppm/L), genera el medio más eficiente para la regeneración de plantas. Sin embargo, aún en los medios

de mejor comportamiento, el número de brotes regenerados es bajo 10 a 15 brotes/callos. Con la adición de ácido naftalenacético (ANA), se obtuvo una respuesta similar a la del 2,4-D, pero se indujo la regeneración de raíces en los callos. Esto confirma que esta auxina tiene una excelente capacidad de inducir la rizogénesis *in vitro*.

Se puede afirmar que la acción generada por la auxina 2,4-D supera la respuesta obtenida con la adición de ANA, siempre y cuando la concentración de CIN se alta, recomendando evaluar otras relaciones hormonales y diferentes reguladores en futuras investigaciones, ya que las estudiadas en este proyecto no generaron respuestas significativas.

Capote, *et al* (2000), aseguran que la regeneración eficiente de callos de monocotiledóneas ha mostrado ser dependiente de varios factores, como el tipo de explante, el medio de cultivo y el tipo de callo obtenido y la regeneración de brotes depende de numerosos agentes, de los cuales el más importante es el nivel de reguladores del crecimiento presentes en el medio de cultivo.

Posiblemente se necesitan concentraciones más altas o más bajas de auxinas y citoquininas para obtener una mejor respuesta al evaluar una especie de escaso conocimiento científico como la Watsimba. No obstante, se observó prendimiento en algunas unidades experimentales, lo cual permite afirmar que la contaminación y la mortalidad son agentes determinantes en un cultivo de tejidos y la regeneración de plantas puede depender de la presencia o ausencia de éstas.

CONCLUSIONES

Las concentraciones de los reguladores hormonales no respondieron con significancia a la regeneración de plantas a partir de meristemas de Watsimba.

Es necesario conocer más ampliamente el comportamiento de la Watsimba a nivel de laboratorio con el fin de utilizar la metodología más adecuada en próximas investigaciones.

Conviene evaluar otros reguladores hormonales y diferentes concentraciones, así como también distintos explantes de Watsimba para observar su respuesta.

Se debe estudiar otro protocolo de desinfección, con el cual se pueda generar una mejor respuesta por parte de los explantes de Watsimba.

BIBLIOGRAFIA

BOTINA, A y A. BRAVO. 2009 Evaluación del comportamiento de la Watsimba *Tigridia pavonia* bajo tres distancias de siembra. Trabajo de Grado I. AF. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Ingeniería Agroforestal. San Juan de Pasto, Colombia. 20 p.

CALLE, V. y Y. TORRES. 1996. Estudios preliminares de propagación vegetativa de pino colombiano (*Prumnopitys sp*). Trabajo de Grado I. F. Universidad del Tolima, Facultad Ingeniería Forestal. Ibagué, Colombia. 35 p.

CAPOTE, A., Z. FUNDORA, y O. PÉREZ. 2000. Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa*, L.) cv. Caribe-71 regeneradas in vitro. En: www.elfosscientiae.cigb.edu.co/ba/2000/17/4/241-246.

CAPOTE, A. y O. PÉREZ. 1997. Estudio de la capacidad organogenética de diferentes explantos de cebolla (*Allium cepa*). En: Agrotecnia de Cuba. La Habana, Cuba. 27 (1). 15 – 18 p.

DE LA BARRERA, E. 2003. Evaluación de un medio de cultivo para la propagación *in vitro* del laurel de cera (*Myrica pubescens* H. & B. K. ex willd). Trabajo de Grado I. AF. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Ingeniería Agroforestal. San Juan de Pasto, Colombia. 83 p.

DE VILLOTA, L. 2005. Documento informe de investigación de Watsimba. Grupo “Exploradores” Escuela Normal Superior Sibundoy – Putumayo. 38 p.

FERNANDEZ, G. Y J. ZAPATA. 1999. Micropropagación de plantas de *Mentha piperita* y evaluación de sus constituyentes volátiles. En: Revista Colombiana de Biotecnología. Medellín, Colombia. 11 (1). 16 – 21 p.

HURTADO, D y M. MERINO. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 227 p.

INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA. 2005 Iridaceae, *Tigridia pavonia*. Hierba de la trinidad, cacomite, flor de tigre. En:<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/379/flora35.html>.

JIMÉNEZ, E. 1998a. Cultivo de ápices y meristemos *En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, IBP. 45-56 p.

JIMÉNEZ, E. 1998b. Generalidades del cultivo *in vitro*. *En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, IBP. 13-24 p.

LOPEZ, J. 1993. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Curso teórico práctico. Facultad de Ciencias Agrícolas. Pasto, Colombia. Universidad de Nariño, 1993. 107 p.

MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 232 p.

PAGUATIAN, A. 2007. Caracterización ecológica y morfológica de la Watsimba *Tigridia pavonia* en los municipios de Santiago y Sibundoy. Trabajo de Grado I. AF. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Ingeniería Agroforestal. San Juan de Pasto, Colombia. 85 p.

PÉREZ, G. 1994. Introducción a la Fisiología Vegetal. España, Ediciones Mundi-Prensa. 218 p.

ROCA, W. y L. MROGINSKI. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, CIAT. 951 p.