

ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE CINCO CULTIVARES DE APIO (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) COLECTADOS EN VENEZUELA

Eduardo Matos¹, María Marcano¹, Carmen Julia Azócar² y Argenis Mora³

RESUMEN

El apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es una planta de la familia Apiaceae, originaria de Los Andes, de raíces reservantes comestibles, de considerable valor nutritivo y apreciado sabor, reconocida como un cultivo con alto potencial especialmente para poblaciones de países en vías de desarrollo. Con el fin de valorar las posibilidades de propagación *in vitro* de esta planta, algunos esfuerzos han sido reportados. El presente trabajo constituye un primer intento para determinar condiciones apropiadas para la micropropagación de cinco cultivares de apio colectados en Venezuela. Para ello, se extrajeron, a partir de cormelos, ápices caulinares de 4 mm que fueron establecidos asepticamente en dos diferentes medios: Murashige y Skoog suplementado con 1 mg·L⁻¹ de BA y 0,1 mg·L⁻¹ de ANA, y medio B5 con 0,3 mg·L⁻¹ de BA y 0,1 mg·L⁻¹ de ANA, expuestos a 16 horas luz/ 8 horas oscuridad, 22-26 °C y 30 μmol·m⁻²·s⁻¹ de irradiancia. Se evaluó tanto el número de brotes regenerados así como el crecimiento y aspecto tisular durante 6 semanas. Se empleó Anavar y prueba de medias para las variables cuantitativas y pruebas de X² para las cualitativas. Se observaron diferencias significativas entre cultivares en el número de brotes y en el crecimiento, obteniéndose un máximo de 4 brotes de 21 mm de longitud, y efecto significativo del medio de cultivo sólo sobre el crecimiento. En la segunda semana, en todos los tratamientos, se evidenció formación de callo conducente a la posterior deshidratación de los tejidos, lo cual fue dependiente del cultivar.

Palabras clave adicionales: Apiaceae, cultivo *in vitro*, deshidratación de los tejidos, formación de callo

ABSTRACT

***In vitro* multiplication of five cultivars of white carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) collected in Venezuela**

Arracacha or white carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) is a plant from the Apiaceae family, native of The Andes, which presents edible storage roots of considerable nutritive value and appreciated flavor; thus, it has been recognized as a crop with a high potential, especially in developing countries. Various efforts to assay the feasibility of *in vitro* propagation of this species have been reported. The present investigation is a first attempt to determine appropriate conditions to micropropagate five arracacha cultivars collected in Venezuela. For this purpose, 4 mm shoot tips were extracted from cormels and were aseptically established in two different media: Murashige and Skoog culture media supplemented with 1 mg·L⁻¹ BA and 0.1 mg·L⁻¹ ANA, and B5 media with 0.3 mg·L⁻¹ BA and 0.1 mg·L⁻¹ ANA, exposed to 16 h of light and 8 h of darkness, 22-26 °C and 30 μmol·m⁻²·s⁻¹ of irradiance. The number of regenerated shoots, growth, and tissue characteristics were evaluated during 6 weeks. Anova and means tests were conducted for quantitative variables and X² tests for qualitative ones. Significant differences observed among cultivars were the number of shoots and growth rates, with a maximum of 4 shoots with 21 mm length. The only significant effect of the culture media detected was on shoot growth. Callus formation was observed in all treatments by the second week with further desiccation of tissues that was dependent on the cultivar

Additional key words: Apiaceae, callus formation, desiccation of tissue, tissue culture

INTRODUCCIÓN

El apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es una planta apiácea, de raíces reservantes

comestibles originaria de la región andina de Sudamérica; de allí se ha extendido a otras regiones del continente americano y del mundo, convirtiéndose en un alimento importante

Recibido: Julio 11, 2014

Aceptado: Febrero 9, 2015

¹ Dpto. de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. e-mail: marseg@ula.ve

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP), Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes

³ Instituto de Investigaciones para el Desarrollo Forestal (INDEFOR), Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

especialmente para poblaciones de países en vías de desarrollo (Hermann, 1997). Es cultivado principalmente en Perú, Colombia, Ecuador, Bolivia, Chile, Venezuela y Brasil y escasamente en Centroamérica y las islas del Caribe (Hermann, 1997). Puede alcanzar rendimientos máximos aproximados de $10 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Hlatky et al., 1988).

La planta crece desde 800 hasta 2800 msnm (Hermann, 1997), donde pueden encontrarse diferentes condiciones ambientales; sin embargo, se cultiva principalmente a altitudes de aproximadamente 1600 msnm con precipitación anual de 800 a 1600 mm (Noriega, 2001).

Para el año 2013, en Venezuela se cultivaron cerca de 4.360 ha de apio, produciéndose unas 55.450 t provenientes principalmente de los estados andinos (FEDEAGRO, 2014); la producción es principalmente destinada al consumo local y regional y ésta genera ingresos a pequeños y medianos productores, sin requerimientos de aportes excesivos de inversión. Existen cultivares morados, blancos y amarillos, y en el país se consumen típicamente los cultivares amarillos (Noriega, 2001).

La forma de propagación tradicional es la vegetativa, constituyendo el cormelo el material de propagación, del que se desarrollan nuevos brotes (Mujica, 1990). De igual manera que la yuca, el ñame y otras plantas, este tipo de propagación exige menor tiempo para llevar a cabo la producción; la reproducción asexual permite además, garantizar homogeneidad en las características y en los rendimientos deseados en los cultivos (Montaldo, 1991). Entre las desventajas de la propagación vegetativa en plantas cultivadas, se puede citar la disminución de la diversidad genética de los cultivares, al mantenerse de manera prolongada ciclos de cultivo de genotipo homogéneo entre individuos, lo que incide en el aumento de la posibilidad de ocurrencia de enfermedades y plagas, promoviendo el deterioro del rendimiento de las plantas (Rojas et al., 2004).

La necesidad de material vegetal de calidad para la siembra, en especial de cultivos propagados vegetativamente ha motivado al estudio de técnicas de propagación *in vitro* de los tejidos vegetales; entre sus principales atractivos está el hecho de que permite producir en un tiempo relativamente corto, una considerable cantidad de material de buena calidad libre de

enfermedades, disponible para ser suministrado a los agricultores, lo que es posible obtener a partir del cultivo de tejidos meristemáticos (Trigiano y Gray, 2005).

Además de los hallazgos derivados de los pioneros estudios de Reinert (1958) sobre la producción de embriones somáticos a partir de callo derivado de ápices radicales de zanahoria (Roca y Mroginsky, 1991), otras especies de apiáceas han sido evaluadas en sus posibilidades de propagación en condiciones *in vitro*; éstas principalmente de uso medicinal; entre ellas, *Centella asiatica* (Shashikata et al., 2005; Raghu et al., 2007), *Heracleum candicans* (Wakhly y Sharma, 1998), *Crithmum maritimum* (Grigoriadou y Maloupa, 2008) y *Bupleurum kaoi* (Chen et al., 2006), han sido cultivadas *in vitro* para su producción y conservación.

En apio, específicamente, se han realizado estudios de micropropagación, empleando ápices caulinares. Por ejemplo, Duque y Landázuri (1999) obtuvieron la mayor cantidad de brotes usando medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con $56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA y 3 % sacarosa. Más recientemente, Madeira et al. (2005) encontraron que el mejor medio de cultivo fue el medio básico B5 (Gamborg et al., 1968) con $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, mientras que para Slíva et al. (2010) el mejor medio fue el MS con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA.

Con el propósito de establecer estrategias de micropropagación a mayor escala mediante un protocolo más definido para proyectos de producción de “semilla” certificada de apio, se propuso el presente trabajo en el que se plantea determinar cuál de dos medios de cultivo evaluados, proporciona las condiciones más adecuadas para la propagación *in vitro* de cinco cultivares de apio de Venezuela, a través del establecimiento de manera aséptica de explantes provenientes de ápices caulinares y de la observación de las respuestas de los mismos en cuanto al número de brotes, al crecimiento de los mismos, a la formación de callo y al deterioro del material durante el tiempo de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: Se cultivaron como explantes, ápices caulinares de 4 mm de longitud,

compuestos de tejido meristemático y primordios foliares, extraídos de cormelos provenientes de plantas adultas. Los cormelos fueron separados de la planta luego de desenterrar las coronas, las cuales fueron replantadas inmediatamente.

Los cultivares evaluados fueron Chamero, Cacho de Buey, Quiroreño, Algodón y Bayuelo, que forman parte de la colección de apio del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP) (Jaimez y Azócar, 2010), adscrito a la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Los Andes, ubicada en la localidad de Santa Rosa, municipio Libertador, estado Mérida, en las coordenadas 08° 35' N, 71°08' W y a una altitud de 1940 msnm, con temperatura media anual aproximada de 26 °C.

Medios de cultivo: Se evaluaron dos medios de cultivo: MSM: Medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 1 mg·L⁻¹ de BA y 0,1 mg·L⁻¹ de ANA (Slíva et al., 2010) y Medio B5M: B5 (Gamborg et al., 1968) con 0,3 mg·L⁻¹ de BA y 0,1 mg·L⁻¹ de ANA (Madeira et al., 2005). El pH utilizado en ambos medios fue de 5,8, la concentración de agar de 0,7 % y la de sacarosa 3 %.

Condiciones ambientales de cultivo: 22-26 °C, 30 μmol·m⁻²·s⁻¹ de irradiancia y fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad.

Desinfección: luego de extraer de cada planta los cormelos, éstos fueron recortados y lavados con una solución jabonosa (jabón comercial). Luego de enjuagarlos con agua corriente hasta eliminar el jabón, se procedió a colocarlos en un frasco, con una solución de Hipoclorito de sodio al 2 % y un par de gotas de Tween 20 agitando suavemente por 15 min. Se retiró el cloro y se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril. Luego, dentro de la cámara de cultivo se procedió a sumergir los cormelos en una solución de etanol al 70 % por 1 min antes de colocarlos en una solución de Hipoclorito de sodio al 1,5 % y dos gotas de Tween 20 por 15 min. Luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Diseño experimental: El diseño experimental que se consideró para la realización del estudio fue el completamente aleatorizado. Los tratamientos consistieron en cinco cultivares de apio sometidos a dos medios de cultivo modificados; constituyendo un arreglo factorial 5 x 2 evaluado semanalmente durante seis semanas. Se consideró cada explante inicial como una unidad

experimental y 12 repeticiones por cada tratamiento.

Las variables evaluadas fueron la longitud del brote de mayor tamaño o crecimiento y el número de brotes formados. Adicionalmente se observó la sobrevivencia y la apariencia de los tejidos debido a la presencia de callo y a la deshidratación de los mismos. La formación de callo fue evaluada en una escala de 3 niveles: 1: sin callo, 2: callo leve (cubría menos del 25 % del tejido de la muestra) y 3: callo moderado (cubría entre 25 y 50% del tejido). La deshidratación fue evaluada como presencia vs. ausencia y fue percibida visualmente según la turgencia que presentaba el tejido.

Para el análisis estadístico, y en el caso de las variables cuantitativas, se aplicó el análisis de varianza para mediciones repetidas en el tiempo sobre la misma unidad experimental basado en el modelo lineal mixto (Blanca, 2004). Este modelo se ajusta muy bien a la estructura de datos colectados en este ensayo y permitió modelar, además, la variación de los mismos dentro de cada semana de observación. La semana se consideró el factor de medición repetida en el tiempo. En los casos donde se encontraron efectos significativos al 5 %, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de medias ajustadas. Por otro lado, las variables cualitativas fueron analizadas a través de pruebas de χ^2 cuadrada. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software libre R (2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobrevivencia: En la fase de establecimiento, el procedimiento de desinfección fue efectivo, obteniéndose contaminación nula y alta sobrevivencia de los explantes (100 %) durante las 3 primeras semanas de cultivo, siendo el ápice caulinar de aproximadamente 4 mm de longitud, un explante adecuado para garantizar baja contaminación, a la vez de responder satisfactoriamente a la brotación *in vitro*.

A medida que avanzaba el estudio, la sobrevivencia fue disminuyendo de manera variable según el medio de cultivo y el cultivar de apio siendo, a la sexta semana, máxima (91,6 %) para Quiroreño cultivado en B5M, y mínima (17 %), para Algodón cultivado en MSM, mostrando el resto de tratamientos sobrevivencias mayores al 50% en la última semana del estudio, sin

presentarse contaminación de los explantes. Esta reducción relativa en la sobrevivencia, se debió al deterioro tisular, manifestado en la formación de callo y en la deshidratación de los tejidos; debido a este daño, importante para determinar la capacidad regenerativa de los explantes, se efectuaron observaciones más rigurosas sobre este particular en el transcurso del experimento.

Longitud del brote de mayor crecimiento:

Según el análisis de varianza aplicado a los datos recopilados (Cuadro 1), se obtuvo que la longitud del brote de mayor crecimiento fue afectada de manera significativa por el medio de cultivo y el cultivar, sin interacción entre ellos. Cuando se incorporó el tiempo en la evaluación, se detectó una interacción con el cultivar ($P \leq 0,01$) lo que indica, que el crecimiento longitudinal de los brotes a lo largo de las semanas de observación fue diferente entre cultivares.

Cuadro 1. Probabilidad estadística (P) de diferencias en la longitud y número de brotes en apio según análisis de varianza de mediciones repetidas

Fuente de variación	Longitud	Número de brotes
	P	
Medio Cultivo	0,004 *	0,260
Cultivar	0,000 *	0,000 *
Medio:Cultivar	0,134	0,517

* Diferencias significativas

En la Figura 1 que muestra la longitud observada en el brote de mayor crecimiento, según cada cultivar y medio de cultivo, se puede tener una visión general de los resultados obtenidos. Se aprecia el lento crecimiento de los explantes, incluso en los que se observaron las mejores respuestas. Es notable la diferencia en las respuestas de bajo crecimiento (menores de 10 mm) de los cultivares Chamero, Quiroreño y Bayuelo en medio MSM, frente al crecimiento (aproximado a 20 mm) de los cultivares Algodón y Cacho de Buey en medio B5M, en el período de evaluación. El mayor crecimiento (21 mm en promedio) se logró en el cultivar Cacho de Buey en medio B5M, mientras que la menor respuesta en crecimiento (5 mm) se obtuvo en el cultivar Quiroreño en medio MSM.

El Cuadro 2 muestra los grupos estadísticos resultantes al realizar la prueba de medias de mínima diferencia significativa de las longitudes obtenidas por los brotes de cada cultivar en la última semana de observaciones. El cultivar Cacho de Buey alcanzó mayor longitud promedio en sus respectivos tratamientos en comparación a Quiroreño, Bayuelo y Chamero.

En medios de cultivo con similar concentración de ANA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y concentraciones variables de BA (0 a $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Madeira et al. (2005) obtuvieron una altura promedio de brotes superior a las que se observaron en este estudio ($55,4$ y $54,8$ mm) trabajando con dos cultivares brasileños. Estos investigadores también evaluaron, en otro experimento, el efecto del ácido giberélico (AG_3) en el crecimiento de los brotes, empleando $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, y de 0 a $0,250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AG_3 , obteniendo alturas medias de $17,2$ mm, los cuales se asemejan a las de nuestro estudio; a pesar de que el AG_3 no indujo una mayor altura de los brotes, estos investigadores encontraron que su uso disminuye la formación de callo.

Número de brotes: El análisis de varianza para el número de brotes (Cuadro 1) reveló que sólo el factor cultivar, influyó en los resultados de manera significativa. De nuevo, se detectó una interacción del tiempo de observación con el cultivar ($P \leq 0,01$).

La Figura 2 muestra el número de brotes regenerados por cada tratamiento. Al final del estudio (Cuadro 3) se verificó que Chamero cultivado en B5M y Cacho de Buey en MSM, seguidos de Algodón en B5M mostraron los mayores valores, entre 3 y 4 brotes en promedio, mientras que Bayuelo y Quiroreño desarrollaron la menor multiplicación en el mismo período, en cualquiera de los medios de cultivo.

En este trabajo se empleó una concentración de auxina ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) y dos concentraciones de BA, añadidas a los medios básicos de Gamborg B5 ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y de MS ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y se observan cultivares que alcanzan la respuesta de multiplicación máxima para el estudio, similares en ambos medios de cultivo. De igual manera, las menores respuestas de multiplicación se obtuvieron en diferentes cultivares en ambos medios de cultivo, lo que impide que alguno de los medios destaque como más adecuado para la respuesta de brotación, tal como es confirmado

por el análisis de varianza. La menor relación auxina/citocinina del medio MSM, sería más favorable a la proliferación de brotes; sin embargo, la similitud de respuestas en ambos medios sugeriría que la concentración de citocinina de B5M (0,3 mg·L⁻¹) es suficiente y concentraciones mayores a ésta no incrementarían las tasas de brotación.

Cuadro 2. Longitud de brotes promedio de apio según el cultivar en la sexta semana del ensayo

Cultivares	Longitud media (mm)
Cacho de Buey	18,08 a
Algodón	14,50 ab
Bayuelo	8,58 b
Quiroreño	8,52 b
Chamero	7,83 b

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes según la prueba mds (P≤0,05)

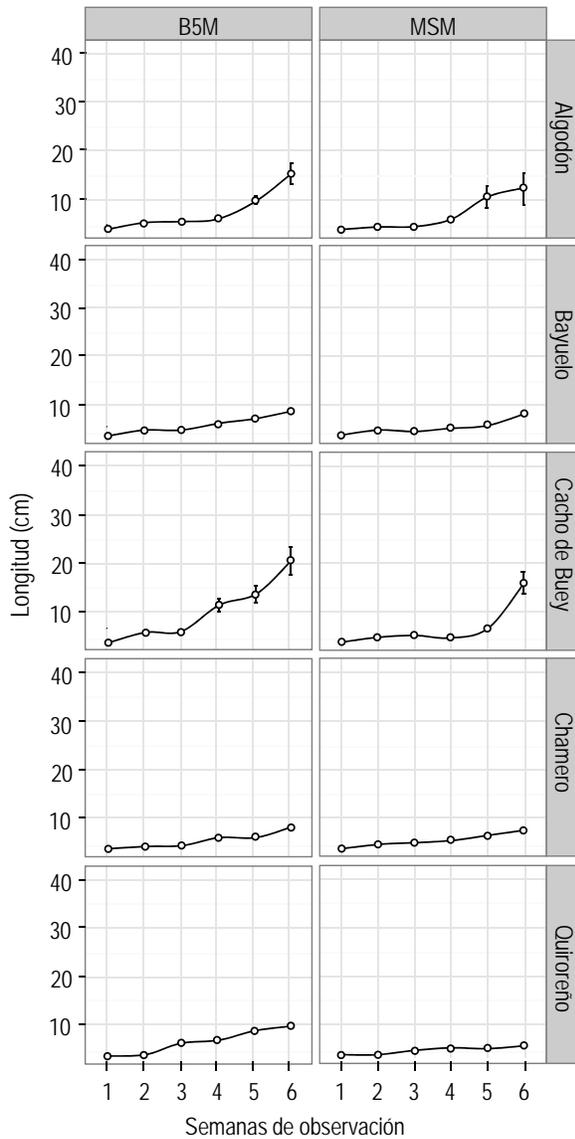


Figura 1. Crecimiento longitudinal de brotes de apio según el cultivar y el medio de cultivo durante el transcurso del ensayo. Las barras verticales indican el error estándar (ausencia de éstas indica que su longitud es menor que la del marcador)

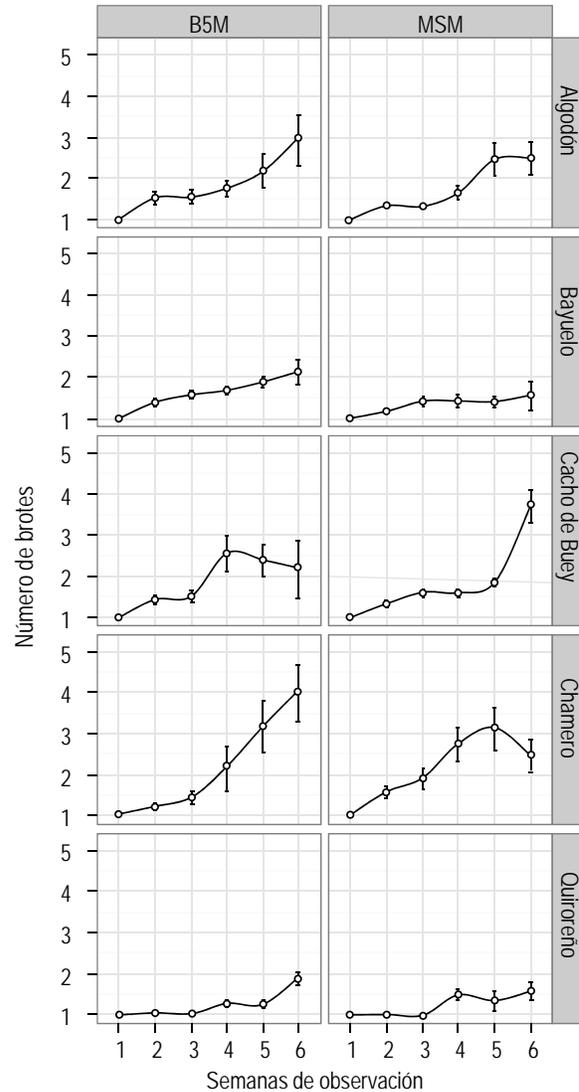


Figura 2. Número de brotes de apio según el cultivar y el medio de cultivo durante el transcurso del ensayo. Las barras verticales indican el error estándar (ausencia de éstas indica que su longitud es menor que la del marcador)

La tasa de multiplicación máxima obtenida en este trabajo, de 4 brotes a partir de uno inicial, ha sido reiteradamente reportada en la literatura. Slíva et al. (2010), reportan que el mejor resultado de brotación fue de 4 brotes ± 0,73 en 4 semanas empleando MS suplementado con 0,1 mg·L⁻¹ ANA y 1 mg·L⁻¹ BA. Madeira et al. (2005), estudiando el medio B5 suplementado con 0,1 mg·L⁻¹ ANA y el rango de concentraciones desde 0 a 0,4 mg·L⁻¹ de BA, encontraron que la ausencia de BA indujo la formación de pocos brotes etiolados y al aumentar su concentración, se incrementaba el número de brotes pero disminuía la altura media alcanzada de los mismos; los autores establecieron que 0,3 mg·L⁻¹ es la que induce la mejor respuesta, que fue de 4 brotes en cuatro semanas, y que ello estaba vinculado al menor desarrollo de callo que se incrementa con la concentración de BA y a la mejor respuesta en el crecimiento de los brotes.

Formación de callo: Como se muestra en la Figura 3, la incidencia de callo comienza en todos los cultivares a partir de la segunda semana de crecimiento (nivel 2), a excepción del cultivar Quiroreño. La aparición de callo nivel 3 (moderado), se registró a partir de la semana 4.

Durante las últimas semanas, la incidencia de callo nivel 3 es general. En el medio MSM (MS + 0,1 mg·L⁻¹ ANA + 1 mg·L⁻¹ BA) se observó que se acelera el desarrollo de callo tipo 2, en todas las semanas, sin considerar los cultivares (datos no mostrados), sin embargo, al final del estudio se observa alta incidencia de callo nivel 3 similar en ambos medios y general para todos los cultivares.

Cuadro 3. Número de brotes de apio según el cultivar y el medio de cultivo en la sexta semana del ensayo

Cultivares	Medio de cultivo	Número de brotes
Chamero	MSM	2,43 bc
Chamero	B5M	4,00 a
Cacho de Buey	MSM	3,71 ab
Cacho de Buey	B5M	2,20 c
Quiroreño	MSM	1,57 c
Quiroreño	B5M	1,91 c
Algodón	MSM	2,50 bc
Algodón	B5M	3,00 abc
Bayuelo	MSM	1,56 c
Bayuelo	B5M	2,12 c

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes según la prueba mds (P≤0,05)

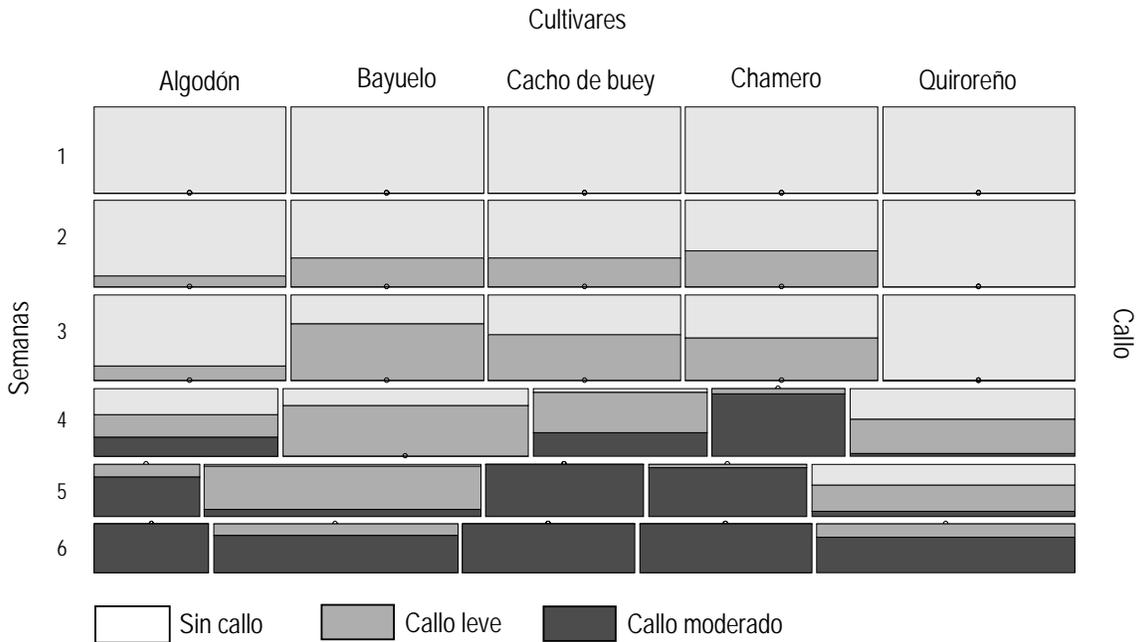


Figura 3. Formación de callo según el cultivar durante el transcurso del ensayo (la dimensión de las secciones es proporcional al tamaño de la muestra, dado que se fueron perdiendo plantas en el transcurso de las 6 semanas. Al inicio n=12)

El análisis de X^2 (Cuadro 4) permite comparar la proporción de medio de cultivo-cultivar que presentó formación de callo en cada semana; la respuesta fue significativa en todas menos en la última semana, en la cual todas las unidades experimentales presentaron alta

incidencia de callo del nivel 3. La eliminación de muestras, por daño total del explante, ocurrió durante las últimas semanas del experimento lo cual está reflejado en la Figura 3 con la reducción del espesor de la barra correspondiente a cada semana.

Cuadro 4. Pruebas de X^2 para formación de callo y deshidratación durante el transcurso del ensayo

Variables	Semanas					
	1	2	3	4	5	6
Callo	-	< 0,01*	< 0,01*	< 0,01*	< 0,01*	0,16
Deshidratación	-	0,06	< 0,01*	0,01*	0,36	< 0,01*

* Diferencias significativas

Se debe tomar en cuenta que los tejidos cultivados involucraban al meristema y a los primordios foliares, incluyendo segmentos de parénquima; este último tipo de tejido tiende a formar callo con facilidad. Al formarse abundante callo puede dificultarse el proceso de toma de nutrientes en detrimento de la formación de hojas y raíces (Castillo, 1991).

El aumento de la concentración de ANA fomenta la formación de callo, y en tal sentido, Slíva et al. (2010) observaron que el aumento de la concentración de ANA, ocasionaba efectos negativos sobre los tejidos, como aumento de la cantidad de callo en la base de las plantas e inclusive disminución en la sobrevivencia de los individuos, de modo similar a lo observado en nuestro experimento.

El tamaño del callo está influenciado por el tamaño del explante y la composición del medio utilizado (David et al., 1981). Las investigaciones de Madeira et al. (2005), Grigoriadou y Maloupa (2008) y Luz et al. (1993) describieron el efecto de la concentración de BA sobre la callogénesis en varias apiáceas, notando que ésta disminuye al aumentar la cantidad de citocinina aplicada y que a partir de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se observan anomalías sobre el desarrollo de los brotes, como la vitrificación en yemas apicales.

En el presente trabajo, se presentó una callogénesis del nivel 2 más temprana en el medio de cultivo suplementado con la mayor concentración de BA ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Considerando que la concentración de auxina fue la misma en ambos medios de cultivo evaluados ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA), se podría sugerir que la concentración de

BA utilizada en el medio MS (con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA) explicaría, en este caso, la aparición de callo más temprana con respecto al B5M (con $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA).

Deshidratación: Se puede observar en la Figura 4 que la incidencia de deshidratación ocurrió en ambos tipos de medios de cultivo y en todos los cultivares, siendo Quiroreño seguido de Bayuelo, los que muestran ser menos susceptibles a esta condición.

La prueba de X^2 , que compara la proporción Cultivar-Medio que presentaron rasgos de deshidratación durante cada semana de observación (Cuadro 4), confirmó que a partir de la 3ª semana y durante las semanas 3, 4 y 6, se observaron diferencias significativas en la proporción de muestras que presentaron deshidratación en los tratamientos.

En el presente estudio los cultivares difieren en cuanto a la propensión a este tipo de estrés, el que aparece con mayor frecuencia a partir de la 4ª semana, posterior al inicio de la formación de callo. El cultivar Quiroreño mantiene de manera más estable la hidratación de sus tejidos a lo largo de su crecimiento (Figura 4), y permanece con relativamente poca formación de callo, aunque también presenta menor crecimiento (Cuadro 2) y menos brotación (Cuadro 3).

La deshidratación en condiciones *in vitro* sería consecuencia de la desecación que sufre el tejido por acción de la luz, la temperatura, componentes del medio de cultivo y otros factores no estudiados.

En la descripción de sus experimentos para lograr organogénesis indirecta, mediada por la

calogénesis, a partir de pecíolos de apio expuestos a 2,4-D, Slíva et al (2010) reportan que después de dos semanas de cultivo en medio con la hormona se produjo un callo basal notable, el

crecimiento de las hojas se detuvo, los brotes se tornaron de color marrón y murieron. De acuerdo a estas observaciones, la deshidratación pareciera vincularse con la formación de callo.

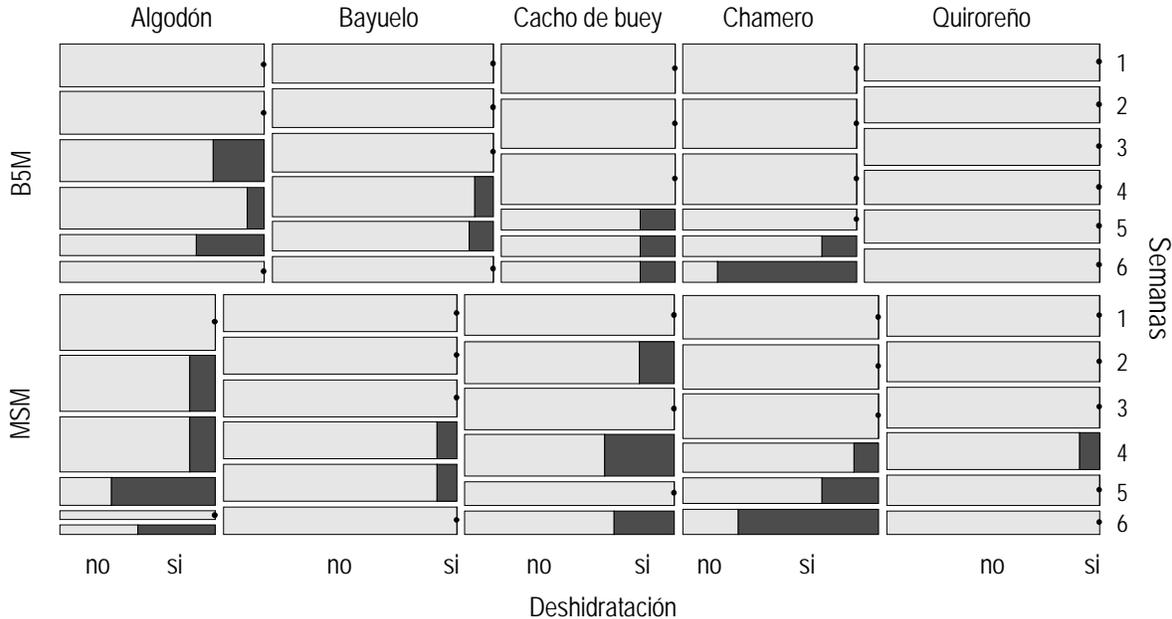


Figura 4. Deshidratación tisular según el cultivar y el medio de cultivo durante el transcurso del ensayo (la dimensión de las secciones es proporcional al tamaño de la muestra, dado que se fueron perdiendo plantas en el transcurso de las 6 semanas. Al inicio n=12)

De acuerdo con los resultados de calogénesis y deshidratación, la semana 4 pudiera sugerirse como la indicada para realizar la transferencia a medios de cultivos de elongación o realizar aclimatación, hasta que puedan definirse en experiencias posteriores condiciones de cultivo *in vitro* alternativas que inhiban la formación excesiva de callo y permitan prolongar el subcultivo, lo que propiciaría mayores tasas de multiplicación.

CONCLUSIONES

Para todos los parámetros evaluados en este estudio (longitud del brote mayor, número de brotes, formación de callo y deshidratación), se encontraron claras diferencias en el comportamiento de los cultivares bajo las condiciones de cultivo consideradas.

El medio B5M (B5 suplementado con 0,1 mg·L⁻¹ de ANA y 0,3 mg·L⁻¹ de BA), resultó el

más conveniente en general para los cultivares evaluados, en relación a la longitud de brotes, pero ninguno de los dos medios de cultivo utilizados fue más favorable para el crecimiento de los explantes.

El cultivar Quiroreño se mostró menos susceptible a la formación de callo y a la deshidratación pero mostró también un bajo desarrollo de brotes.

El cultivar Cacho de Buey cultivado en medio MSM mostró respuestas máximas de brotación de 4 brotes y 18 mm de longitud en 4 semanas y resistencia adecuada ante las condiciones de cultivo.

LITERATURA CITADA

1. Blanca, M.J. 2004. Alternativas de análisis estadístico en los diseños de medidas repetidas. *Psicothema* 6(3): 509-518.
2. Castillo, R. 1991. Manejo e conservação de germoplasma de tuberosas andinas. Centro

- Internacional de la Papa (CIP). Quito. 7 p.
3. Chen, U., C. Hsia, M.S. Yeh y H. Tsay. 2006. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kanoi*, an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42: 128-133.
 4. David, A., W. Sharp y C. Flick. 1981. Growth and behavior of cell culture, embryogenesis and organogenesis. *In: Thorpe T.A (ed.). Plant Tissue Culture, Methods and Application in Agriculture.* Academic Press. NY. pp. 45-130.
 5. Duque, L. y P. Landázuri. 1999. Introducción, micropropagación, conservación *in vitro* y aclimatización a invernadero de *A. xanthorrhiza*. Centro Internacional de la Papa. CIP. pp. 93-110. Lima, Perú.
 6. FEDEAGRO (Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios). 2014. Indicadores de la producción por grupo de cultivo. Raíces y tubérculos. <http://www.fedeagro.org/> (consulta del 23/11/2014).
 7. Gamborg, O.L., R.A. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158.
 8. Grigoriadou, K. y E. Maloupa. 2008. Micropropagation and salt tolerance of *in vitro* grown *Crithmum maritimum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 94(2): 209-217.
 9. Hermann, M. 1997. Apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *In: M. Hermann y J. Heller (eds.) Andean root and tubers: Ahipa, Apio, Maca y Yacon.* IPGRI Rome, Italy. pp. 75-172.
 10. Hlatky, A. y F. Romero. 1988. Descripción agronómica del cultivo de zanahoria blanca. VI Congreso Internacional sobre cultivos andinos. Quito.
 11. Jaimez, R. y C. Azócar. 2010. Banco de germoplasma de apio andino (*A. xanthorrhiza* Bancroft). Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP). Mérida Venezuela. <http://webdelprofesor.ula.ve/forestal/rjaimez/> (consulta del 09/02/2015).
 12. Luz, J.M., M. Pasqual y R.J. Souza. 1993. Cultura de tejidos e biotecnologia em mandioquinha-salsa. Informe Agropecuar Belo Horizonte 19(190): 18-21.
 13. Madeira, N., J. Teixeira, C. Arimura y C. Junqueira. 2005. Influência da concentração de BA e AG₃ no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. *Horticultura Brasileira* 23(4): 982-985.
 14. Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. San José, Costa Rica. IICA. pp. 297-304.
 15. Mujica, A. 1990. La arracacha en el Perú. Programa de investigación de cultivos andinos. Instituto Nacional de Investigación Agraria y Agroindustrial. Puno, Perú. 20 p.
 16. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
 17. Noriega, L. 2001. El apio andino (*Arracacia xanthorrhiza*, Bancroft) y su cultivo en Capurí, Río Negro y El Molino. Mérida-Venezuela.
 18. Raghu, A., G. Martin y V. Priya. 2007. Low cost alternatives for the micropropagation of *Centella asiatica*. *Journal of Plant Sciences* 2(6): 592-599.
 19. Reinert, J. 1958. Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonene an gewebeulturen aus karotten. *Planta* 53:318-333.
 20. Roca, W. y M. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT. Cali, Colombia. 967 p.
 21. Rojas, S., J. García y M. Alarcón. 2004. Propagación Asexual de Plantas. Corpoica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. 56 p.
 22. Shashikata, C., S. Shashidhara y P. Rajeshkharan. 2005. *In vitro* regeneration of *Centella asiatica* L. *Plant Cell Biotechnol. Mol.* 6: 53-56.
 23. Slíva, Š., I. Viehmannová y J. Vítámvás. 2010. Micropropagation and morphogenesis of apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Agricultura Tropica et Subtropica* 43(3): 206-211.
 24. Trigiano, R. y D. Gray. 2005. Plant Development and Biotechnology. University of Florida. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 57-89.

25. Wakhly, A. y R. Sharma. 1998.
Micropropagation of *Heracleum candicans*

Wall: A rare medicinal herb. *In Vitro Cell.*
Dev. Biol. Plant 35: 79-81.