

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE TRES TIPOS DE INJERTOS UTILIZADOS EN LA INDIZACIÓN DE YUCA

Roa, J.C; Flor, N.C; Ramírez, J.L ; Mafla, G; Pineda, B y Debouck, D.

Unidad de Recursos Genéticos. Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT -. A.A. 6713, Cali.

INTRODUCCIÓN

95768

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es actualmente uno de los cultivos de mayor importancia en la Economía Nacional y como tal ha sido incluida en los planes de fomento del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, como parte integral de las cadenas productivas. Por sus características de propagación (trozos de tallo lignificado) el éxito de su establecimiento depende en gran parte de la disponibilidad de propágulos libres de enfermedades de carácter sistémico que, como la enfermedad del "cuero de sapo" (ECS), pueden producir pérdidas hasta del 100 % (Pineda et al., 1983). En la actualidad la ECS, de naturaleza viral compleja, representa uno de los mayores riesgos, tanto para el intercambio de germoplasma como para el establecimiento de plantaciones comerciales. La obtención de plantas libres de virus es de gran importancia en el establecimiento del cultivo en sí (Lozano et al., 1982) y para la conservación de germoplasma, su distribución e intercambio (Frison y Feliu 1991), pero se requiere disponer de sistemas de indización rápidos y precisos que garanticen su sanidad (Roca y Mroginski, L, 1991).

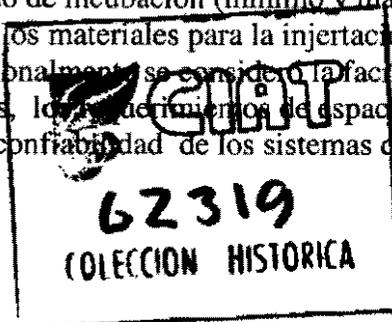
En la certificación de la sanidad de los propágulos, ya sea obtenidos de plántulas *in vitro* mediante termoterapia y cultivo de tejidos apicales o a partir de plantas de campo, se pueden utilizar técnicas serológicas, bioquímicas o moleculares para los virus que afectan el germoplasma, siempre y cuando estén disponibles. Para el caso del "cuero de sapo", aún no se han desarrollado esta clase de técnicas; solamente se dispone de la injertación con el clon M Col 2063, indicador de virosis.

En el CIAT, de manera rutinaria, se utilizó para la indización contra ECS el injerto de estacas gruesas (Pineda, B; Bedoya, A. y Rodríguez, C. T, datos no publicados); sin embargo, a pesar de la alta eficiencia (100%) en el prendimiento de los injertos y confiabilidad de los resultados, el tiempo de producción en el campo de las estacas del clon indicador garantizado (8-12 meses), el nivel de riesgo de reinfección por el vector *Bemisia tuberculata*, el espacio y la cantidad de suelo requeridos para la ejecución de la técnica resultaron poco prácticos para su realización en forma masiva.

Para contribuir con la búsqueda de alternativas de injertación más eficientes, en la Unidad de Recursos Genéticos se planeó evaluar tres variantes de la técnica: microinjertación *in vitro*, injerto de "vitroplantas" sobre brotes de estacas e "injerto inglés" sobre tallos delgados enraizados en agua; buscando determinar cual podría ser la más funcional, confiable y más rápida en la obtención de resultados.

En la evaluación se tuvo en cuenta el período de incubación (mínimo y máximo), el porcentaje de establecimiento de injertos, la edad óptima de los materiales para la injertación (patrón, injerto) y la sensibilidad de detección de las técnicas. Adicionalmente se consideró la facilidad de ejecución, el nivel de habilidad y preparación de los ejecutores, los requerimientos de espacio e instalaciones, y otros aspectos relacionados con la practicabilidad y confiabilidad de los sistemas de indización.

MATERIALES Y MÉTODOS



El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Sanidad de Germoplasma y Cultivo de Tejidos de la Unidad de Recursos Genéticos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Para dicho ensayo, se cosecharon 25 clones con síntomas de la enfermedad del cuero de sapo con tres grados de severidad diferentes (leves, moderados, severos).

De cada clon y para cada técnica se obtuvieron dos estacas de aproximadamente 15 cm de longitud, posteriormente se desinfectaron con Dimetoato (Sistemín) al 0,3 % y se sembraron en vasos de icopor con suelo pasterizado.

Como clon indicador se utilizó la variedad M COL 2063 (conocida como Secundina en la Costa Norte Colombiana), altamente susceptible a virosis y debidamente certificada.

Como controles se incluyeron injertos realizados con los mismos materiales del clon indicador, utilizados en la realización de la investigación.

Las metodologías de las tres técnicas de injertación utilizadas para la indización de los materiales se describen a continuación:

Técnica del micro – injerto

Las estacas madres se llevaron a una cámara de crecimiento con una temperatura de 30 °C hasta la obtención de yemas axilares, evento que ocurrió aproximadamente a los 20 días. Estas yemas se cortaron y bajo condiciones de laboratorio y dentro de una cámara de flujo laminar se realizaron los siguientes pasos: las yemas contenidas en vasos de precipitado de 50 ml se desinfectaron dos veces: la primera con alcohol al 70 % durante 10 segundos y la segunda con hipoclorito de sodio al 0,5 % durante 5 minutos, realizando lavados con agua destilada estéril entre cada paso. De estas yemas se extrajeron ápices de ocho primordios y se sembraron en tubos que contenían medio de cultivo Murashige y Skoog modificado (Roca, W, et al., 1984), luego se llevaron a un cuarto de crecimiento con 28 °C de temperatura, fotoperíodo de 12 horas e intensidad de 2000 lux.

Al cabo de 90 días se obtuvieron plántulas de tallo vigoroso y lignificado procediéndose a micro-injertar con el clon Secundina. Para obtener el micro-injerto se realizó un corte en la parte apical del patrón a una altura de 3 cms y luego se hizo una incisión de 0,5 cms de profundidad, sobre ésta hendidura se insertó el clon indicador.

Los micro – injertos se llevaron a un cuarto de crecimiento con 24 °C de temperatura, fotoperíodo de 12 horas, humedad relativa del 60 % e intensidad de 2000 lux (Figura No. 1).

Técnica del injerto en brote

Las estacas madres se localizaron bajo condiciones de temperatura ambiente hasta que de las yemas axilares crecieron brotes formando tallos. Posteriormente se realizó un corte en la parte terminal del tallo a una altura de 5 – 7 cms con una cuchilla evitando que se presentara necrosis en el tejido; sobre éste corte se hizo una incisión de 1 cm de profundidad y se eliminaron las yemas axilares. Luego se realizó un corte en la parte basal del tallo de la plántula de Secundina y ésta se insertó en la hendidura del patrón sujetándose con cintas de "parafilm".

Finalmente los injertos se cubrieron con una bolsa de plástico transparente para evitar la deshidratación y se llevaron a una cámara de crecimiento con 25 °C de temperatura, fotoperíodo de 12 horas e intensidad de 2000 lux (Figura No. 2).

Técnica del injerto inglés

Se utilizó la técnica de injerto inglés (lengueta o látigo) según lo descrito por Hartmann y Kester. (1971) con algunas modificaciones. Las estacas madres fueron colocadas bajo condiciones de cuarto

de crecimiento hasta la obtención de brotes lignificados, situación que ocurrió a los 25 días. Se cortaron los brotes para utilizarlos como patrón y se realizó en cada uno de ellos un corte transversal definido en la parte superior, a su vez un corte de la misma longitud se efectuó en estacas de similar desarrollo del clon indicador; en éstas el corte se realizó en la parte inferior. Se eliminaron todas las yemas presentes en los patrones para evitar su desarrollo. Una vez ejecutados los cortes, ambos extremos se unieron sólidamente con cintas de "parafilm" para asegurar el establecimiento del injerto.

Los clones injertados se colocaron en frascos de vidrio estériles conteniendo agua destilada y se ubicaron bajo las condiciones de un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas luz y temperatura de 26 °C (Figura No. 3).

En cada técnica se realizaron dos repeticiones por cada clon. Las evaluaciones se realizaron tan pronto fue posible la observación de síntomas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, después de aplicar la metodología descrita, muestran que las tres técnicas de injertación detectan los materiales afectados por la ECS, en los tres niveles de severidad de la enfermedad, con algunas diferencias (Tabla 1).

La evaluación del porcentaje de prendimiento de las tres técnicas para observar su eficacia como método de diagnóstico mostró que, a pesar de la mortalidad de algunos injertos, el porcentaje de prendimiento en este ensayo bajo las condiciones mencionadas con la técnica de la micro-injertación fue del 100 %, del 92 % con la técnica del injerto en brote y del 93,6 % con la técnica del injerto inglés, observándose que a pesar de las pérdidas totales evaluadas, en todas las técnicas las cifras fueron altas (Tabla 2).

Describiendo los datos obtenidos en porcentaje puede observarse que un 48 % de detección de síntomas fue obtenido con la técnica de la micro-injertación *in vitro*, un 76 % con la técnica de injerto en brote y un 100 % con la técnica del injerto inglés sobre brotes enraizados en agua (Tabla 2).

El hecho de que el porcentaje de injertos con síntomas en la microinjertación *in vitro* y del injerto de vitro plantas en brotes hubiera sido menor que en la técnica del injerto inglés sobre brotes enraizados en agua, podría explicarse por las diferencias observadas en la formación de la conexión vascular entre el patrón y el injerto. Las observaciones realizadas mostraron que los micro-injertos *in vitro* y los injertos de vitroplantas en brotes que expresaron síntomas, presentaron un mejor contacto con el patrón, formando un callo uniforme a lo largo del corte longitudinal de la base del injerto. Se están efectuando verificaciones adicionales y ajustes a las dos técnicas para lograr mayor eficiencia en la expresión de síntomas.

En el caso del injerto inglés sobre brotes enraizados en agua la fusión de tejidos del patrón y el injerto fue completa; lo que explicaría su alta eficiencia en la expresión de síntomas. Según Hartmann y Kester, (1971) debe existir una presión del patrón hacia el injerto que permita el establecimiento de la conexión vascular para facilitar el flujo seguro de savia y por ende la translocación del virus, si éste está presente.

Si se comparan las tres técnicas de injerto evaluadas con la injertación tradicional (injerto Inglés sobre estacas), éstas resultan más eficientes en cuanto al tiempo total requerido para el diagnóstico (Tablas 2 y 3) y poseen menos riesgos de reinfección con la ECS por presencia de *B. tuberculata*. Al momento el injerto inglés sobre brotes enraizados en agua es el más eficiente (Tabla 2). Sin embargo se espera que una vez efectuadas las verificaciones y ajustes del caso las otras dos técnicas se puedan aplicar para la indización pues prometen ser más eficientes y seguras.

CONCLUSIONES

1. Todas las técnicas utilizadas en este ensayo corroboraron la presencia de virosis observada en los materiales cosechados en campo, virosis posiblemente asociada al complejo de virus del "cuero de sapo".
2. Las técnicas generan óptimos resultados cuando las condiciones ambientales para la expresión de síntomas son las adecuadas y el tipo de material tanto del clon indicador como del patrón es el requerido.
3. Los tres tipos o variantes de la injertación son funcionales y tienen aplicabilidad según los requerimientos de indización por tipo y clase de materiales y dependen de las facilidades y disponibilidad de recursos de quienes las practiquen.
4. El porcentaje de prendimiento con las tres técnicas evaluadas fue elevado, sin embargo se recomienda que para la realización de cada una de ellas sea necesaria una capacitación dirigida.
5. La técnica de injerto en brote podría ser la alternativa más adecuada para evaluar material que proviene de campo en un tiempo más corto del que se necesita para obtener resultados mediante la utilización del injerto inglés con estacas gruesas (injerto tradicional).
6. La técnica del injerto inglés sobre brotes enraizados en agua fue la más eficiente, teniendo en cuenta que detectó la totalidad de los clones afectados con la ECS en un tiempo relativamente aceptable.

REFERENCIAS

1. Frison, E.A. y Feliu, E. 1991. FAO/IBPGR TECHNICAL GUIDELINES for the SAFE MOVEMENT OF CASSAVA GERMPLASM. Food and Agriculture Organization of the United Nations -FAO- and International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). Rome, Pág: 6.
2. Hartmann, H y Kester, D. 1971. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Compañía Editorial Continental, S.A. México. Primera publicación. 810 págs.
3. Lozano, J.C; Toro, J.C; Castro, A y Belloti, A.C. 1982. Selección y preparación de estacas de yuca para siembra de yuca. En: PNUD, CIAT. 1982. Yuca: Producción y utilización. Editorial XY2. Págs: 209 - 230.
4. Pineda, B.; Jahasinghe, V y Lozano, J.C. 1983. La enfermedad del "Cuero de sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz.). Revista ASIAVA. (Colombia). Vol. 4, Págs 10 - 12.
5. Roca, W. M., Rodríguez, J.A., Mafla, G., Roa, J.C. 1984. Procedures for Recovery Cassava clones. Distributed in vitro. Cali - Colombia. 8 págs.

6. Roca, W; Nolt, B; Mafla, G; Roa, J.C y Reyes, R. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W y Mroginski, L (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Págs: 401-420

Tabla 2. Comparación de los métodos de injertación evaluados en el ensayo

Método	Edad de utilización (Semanas)		Prendimiento %	Injertos con síntomas %	Período de incubación (Semanas)	Tiempo total diagnóstico (Semanas)	Nivel de precisión	Nivel de Riesgo ²
	Patrón	Injerto						
Microinjerto <i>in vitro</i>	17	3	100	48	3-4	24	V.A.E.P ¹	Muy bajo o ausente
Injerto de "vi- troplantas" sobre brotes de estacas	3-5	4	92	76	2-3	12	V.A.E.P	Bajo a moderado
Injerto "in- glés" sobre brotes enrai- zados en agua	3-4	10	93,6	100	0,3 -1,3	15,3	Alto	Bajo a moderado
Injerto "In- glés" sobre estacas*	34	34	100	...	3-4	72	Alto	Moderado a alto

* Referencia: Pineda, B; Bedoya, A y Rodríguez, C. T, datos no publicados. ¹ Verificación Adicional En Proceso ² Riesgo de reinfección del injerto indicador por presencia de *B. tuberculata* vector de la enfermedad del "cuero de sapo"

Tabla 3. Requerimientos , usos y costo estimado de los métodos de injertación utilizados en la indización de *Mangifera indica* Crantz

Método	Requerimientos				Usos de la técnica	Costo estimado
	Material vegetal		Infraestructura y equipo	Capacitación		
	Patrón	Injerto				
Microinjerto <i>in vitro</i>	Plántulas <i>in vitro</i>	Plántulas <i>in vitro</i>	Instalaciones y equipo de lab. cultivo tejidos	Alta	Indización en procesos de introducción , distribución de germoplasma y certificación de material básico de propagación	Alto
Injerto de vitro plantas sobre brotes de estacas	Estacas de Plantas maduras	Plántulas <i>in vitro</i>	Instalaciones y equipo lab. cultivo tejidos, "Cuarto de crecimiento" ¹	Moderada a Alta	Evaluación de materiales procedentes de campo para certificación de sanidad	Moderado
Injerto inglés sobre brotes enraizados en agua	Brotes o retoños de estacas maduras	Estacas de plantas jóvenes	Invernadero, "Cuarto de crecimiento" ¹	Moderada	Evaluación de materiales procedentes de campo y/o certificación de sanidad post termoterapia y cultivo de tejidos	Moderado
Inglés de estacas (Ref)	Estacas de plantas maduras	Estacas de plantas maduras	Invernadero o casa de malla ² ; Lote aislado	Moderada	Evaluación de materiales procedentes de campo para certificación de sanidad	Moderado a alto

¹ El cuarto debe proveer condiciones de temperatura entre 20-27°C, iluminación con una intensidad de 2000 a 5000 lux y poseer controles de tiempo y temperatura. ² Deben acondicionarse para que provean las condiciones de temperatura e iluminación requeridas para la expresión de síntomas