



16645

En 1980 las actividades de la sección de Cultivo de Tejidos se concentraron en el mejoramiento y aplicación de la técnica del cultivo de meristemas, a la vez que se iniciaron trabajos en relación con otros cultivos de tejidos.

### **Cultivo de Meristemas de Yuca**

Los trabajos sobre cultivo de meristemas se orientaron de una manera especial hacia la erradicación de enfermedades y a la conservación e intercambio internacional de germoplasma.

#### **Mejoramiento de la Técnica del Cultivo de Meristemas**

La exitosa regeneración de plantas de yuca a partir de cultivos de meristemas depende de la interacción del genotipo con la composición química del medio de cultivo (CIAT, Informe Anual 1978).

En el cultivo de meristemas, las variedades de yuca respondieron de modo diferente a la formación simultánea de retoños y raíces en un medio dado (Figura 1a). Sin embargo, la mayoría de las variedades tendieron a diferenciar retoños más consistentemente que raíces; por lo tanto, se ideó un sistema mejorado de dos fases que permite la regeneración de plantas en forma completa independientemente de la variedad; la técnica se muestra en la parte b de la Figura 1.

Con ese sistema, en cuatro o cinco semanas, cada meristema da origen a tres plántulas; de allí en adelante cada cultivo se puede multiplicar de nuevo cinco veces cada mes, mediante el cultivo de nudos; además, una vez que los retoños se han diferenciado en cultivos de retoños múltiples (CIAT, Programa de Yuca, Informe Anual, 1979), también se pueden multiplicar a través de cultivos de nudos. Más de 600 variedades de yuca se han procesado exitosamente de esta manera.

### **Erradicación de la Enfermedad Cuero de Sapo**

Para limpiar los materiales de yuca infectados con la enfermedad cuero de sapo se ha empleado un método que consiste en cultivar ápices meristemáticos de 0.5 a 0.6 mm, provenientes de retoños de estacas que han crecido durante tres a cuatro semanas a temperaturas de 40°C en el día y 35°C en la noche.

La efectividad de la técnica se probó mediante la propagación en el campo, y por ciclos consecutivos, de estacas de plantas provenientes de meristemas. Al final del primer ciclo, en ocho de los 13 cultivares probados el 100% de las plantas estaba libre de la enfermedad y en cinco de ellos había un 82 a 90% de plantas libres; después del segundo ciclo de propagación todos los cultivares resultaron 100% libres de la enfermedad.

Utilizando la metodología del cultivo de meristemas y termoterapia para controlar la enfermedad de cuero de sapo, se inició en 1980 un trabajo de rutina para limpiar los materiales de yuca de diversa procedencia; se incluyeron tanto algunos materiales infectados con la enfermedad como otros sin infecciones aparentes y materiales coleccionados y traídos al CIAT en forma de cultivos de meristemas. Así, cerca de 300 cultivares se recuperaron por cultivos de meristemas, se sembraron en materos y se entregaron al Programa de Yuca.

**Estudios en injertos.** Se sabe que la enfermedad cuero de sapo se transmite en un 100% hacia abajo a través de la unión del injerto (CIAT, Informe Anual 1977); pero comprender el alcance de la transmisión ascendente también puede ser importante para los estudios sobre la traslocación y diseminación del agente causal.

Utilizando plantas libres de la enfermedad provenientes de cultivos de meristemas, y plantas enfermas, se realizaron injertos recíprocos (esquejes enfermos sobre porta-injertos sanos y viceversa) con cuatro variedades de yuca. A lo largo del esqueje de cada injerto recíproco se hicieron cortes de tallos a varias alturas, se enraizaron y se cultivaron en el invernadero.

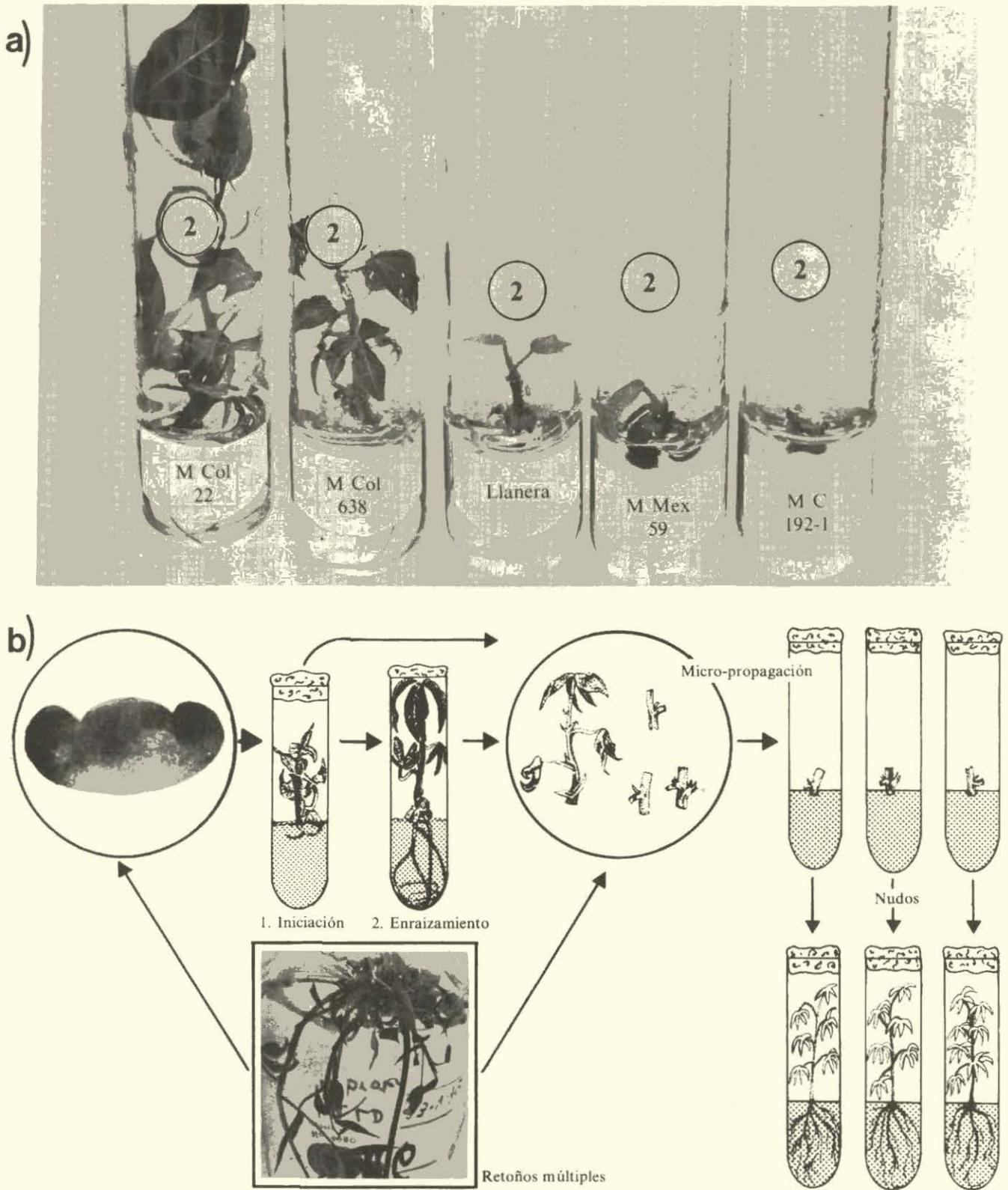


Figura 1. El desarrollo simultáneo de retoños y raíces en un solo medio está influenciado por el genotipo (a). Mediante una técnica de dos fases se pueden regenerar plantas de yuca a partir de cultivos de meristemas independientemente de la variedad (b).

Todas las raíces de los injertos normales y de los recíprocos (esquejes sanos sobre porta-injertos enfermos) mostraron síntomas de la enfermedad tres a cuatro meses después de realizado el injerto. El mayor grado relativo de síntomas y el número más grande de raíces con síntomas se observó en los esquejes del tallo más cercanos a la unión del injerto; el menor número de síntomas se observó en los esquejes procedentes de la parte superior del tallo (Cuadro 1).

Sorprendentemente, cuando el cultivar M Col 721 se usó como esqueje libre de enfermedad, no se detectaron síntomas en ninguna de las plantas procedentes de sus cortes de tallo, aun cuando los síntomas de la enfermedad estaban presentes cuando el mismo clon actuó como porta-injerto. Esto puede sugerir que hay factores estructurales que impiden la traslocación de la enfermedad hacia arriba, aunque ésta se puede mover libremente hacia abajo.

Cuadro 1. Transmisión de la enfermedad cuero de sapo a través de injertos recíprocos entre diferentes variedades de yuca.

Injerto <sup>1</sup>		Transmisión descendente	Transmisión ascendente		
Esqueje	Porta injerto		Posición del esqueje en el tallo <sup>2</sup>	Síntomas relativos	Raíces con síntomas/total <sup>3</sup>
M Col 67*	M Col 67	100%			
M Col 67	M Col 67*		1	+	2/6
			2	++	2/4
			3	+++	8/8
			4	++++	10/10
M Col 67*	M Col 33	100%			
M Col 33	M Col 67*		1	+	3/6
			2	+	4/8
			3	++	10/10
			4	+++	8/8
M Col 67*	M Col 721	100%			
M Col 721	M Col 67*		1	-	0/6
			2	-	0/5
			3	-	0/10
			4	-	0/8
M Col 329*	M Col 721	100%			
M Col 721	M Col 329*		1	-	0/6
			2	-	0/8
			3	-	0/10
			4	-	0/12

<sup>1</sup> El asterisco (\*) señala las plantas enfermas; las otras son plantas libres de enfermedades, provenientes de cultivos de meristemas.

<sup>2</sup> Altura del corte del tallo con respecto a la unión del injerto en plantas que muestran síntomas de cuero de sapo en la raíz; 1= brote superior; 4= brote más cercano a la unión del injerto.

<sup>3</sup> No. de raíces con síntomas/No. total de raíces con un diámetro mayor de 0.5 cm.

### Conservación de Germoplasma

Se han diseñado condiciones para mantener *in vitro* materiales de yuca provenientes de meristemas, por prolongados periodos; dichas condiciones permiten disminuir al mínimo la tasa de crecimiento de los cultivos mientras se aumenta al máximo su viabilidad. El trabajo ha demostrado la importancia no sólo de la temperatura y

la iluminación del almacenamiento sino también de la composición del medio del cultivo. La tasa de crecimiento de los retoños en cultivos de meristemas se relacionó directamente con la temperatura del almacenamiento, dentro de los límites relativos de 15 a 35°C y dependiendo de los materiales. Las temperaturas inferiores a 18°C disminuyeron el crecimiento en la mayoría de las variedades, especialmente después de tres a cinco meses de exposición.

La cantidad de raíces formadas durante el almacenamiento también es importante. El enraizamiento rápido acortó el período de transferencia de los cultivos a tubos con medios frescos, debido al deterioro ocasionado por la oxidación de exudados de tipo fenólico liberados al medio por las raíces antiguas.

La temperatura baja, que retarda el crecimiento de los retoños, tendió a fomentar el enraizamiento. La alta iluminación (cerca de 4000 lux) también favoreció el enraizamiento; cuando se disminuyó la iluminación y se alteró la composición del medio de cultivo al agregar un alto nivel de citoquinina y una baja concentración de sucrosa, no sólo se retardó el enraizamiento sino que los cultivos permanecieron altamente viables, de manera que el período de transferencia se alargó a dos años por lo menos.

Por consiguiente, las condiciones determinadas para el almacenamiento *in vitro* de cultivos de yuca provenientes de meristemas son:

Temperatura: 20-22° C  
Iluminación: 1000 - 1500 lux  
Fotoperíodo: 12 horas  
Medio de cultivo: Sales minerales de Murashige-Skoog.  
Baja sucrosa  
Citoquinina alta  
Alta giberelina  
Agar  
Tipo de cultivo: Cultivos nodales y cultivos de retoños múltiples en tubos de ensayo.  
Período de transferencia: Cada dos años

Con el objeto de establecer *in vitro* el banco de germoplasma de yuca del CIAT, este año se instaló un cuarto (3 m de ancho x 4 m de largo x 2.5 m de alto) con las condiciones antes citadas. El cuarto puede almacenar más de 14,000 tubos de ensayo con cultivos (Figura 2).



Figura 2. Cuarto de almacenamiento para cultivos *in vitro* provenientes de meristemas de yuca, en la unidad de Recursos Genéticos del CIAT. El cuarto, con luz y temperatura controladas, tiene capacidad para más de 14,000 tubos de ensayo.

Se están transformando rutinariamente materiales de yuca de diverso origen en cultivos de meristemas para su almacenamiento *in vitro*. Se da prioridad a los materiales libres de la enfermedad cuero de sapo, a los clones del banco de germoplasma, a líneas híbridas avanzadas, y a materiales recientemente introducidos al CIAT.

Hasta noviembre de 1980, se mantuvieron materiales por más de dos años sin volver a rellenar el medio de cultivo; otros materiales se preservaron durante 15 a 18 meses y la mayor parte de las variedades se conservaron hasta por un año. A lo largo del almacenamiento, los cultivos produjeron yemas axilares nuevas.

El número promedio de las yemas axilares por variedad se relacionó directamente con la capacidad de regeneración de la planta después de su recuperación del almacenamiento; así, ese número es una medida de la viabilidad del cultivo. En promedio, las variedades de yuca almacenadas han producido al menos tres yemas axilares durante períodos de almacenamiento de tres a 24 meses y la variabilidad de esta respuesta entre las diferentes variedades es lo suficientemente baja (0.12-0.17 C.V.) para ofrecer confianza en la aplicación de la técnica.

Es importante comprobar si las características varietales de los materiales permanecen estables durante largos períodos de almacenamiento; con este fin, cada seis y doce meses algunos cultivos de meristemas se han restaurado, propagado y trasplantado al campo para su comparación con materiales propagados por estaca. En términos del crecimiento general y de la morfología de la parte aérea y de las raíces, las plantas almacenadas *in vitro* permanecieron exactas en tipo; además, los materiales provenientes de meristemas mostraron en el campo menos variación que los materiales provenientes de estacas. Este trabajo continúa.

### **Intercambio Internacional de Germoplasma**

Durante 1980, se enviaron 61 variedades de yuca del CIAT a ocho países como cultivos asépticos de meristemas.

Como seguimiento a un curso de adiestramiento sobre el cultivo de meristemas de yuca y en forma de ensayo, se distribuyeron 18 variedades a cinco países del sureste asiático. Los resultados preliminares mostraron que el éxito en el uso del método depende principalmente de dos factores, esto es, de las condiciones de llegada de los cultivos las cuales dependen a su vez de la distancia del

transporte, y de la eficacia con que aquellos se manejen después del arribo.

En el primer envío, que fue preparado y llevado a mano por los becarios mismos, se obtuvo un 45 a 70% de éxito en el manejo; los últimos envíos a Tailandia y Malasia se manejaron con mayor éxito (85-95%) como se pudo apreciar de la información suministrada por los becarios (Cuadro 2). Algunos cultivos presentaron a su llegada deterioro por clorosis y por oxidación fenólica, producida por la prolongada oscuridad (envíos aéreos de 25 a 30 días); sin embargo, después de un manejo apropiado dieron origen a plantas.

Otras 43 variedades de yuca enviadas a Brasil, Costa Rica y los Estados Unidos en un total de nueve despachos, llegaron en buenas condiciones cuando se llevaron a mano o después de viajes aéreos de 3 a 12 días.

Con el fin de reducir al mínimo los efectos perjudiciales de los viajes largos sobre los cultivos, se están realizando investigaciones que permitan acondicionar los materiales para soportar largos períodos de oscuridad sin daños irreversibles e implementar métodos rápidos de propagación de los materiales recuperados después de su distribución por CIAT. Se está adaptando a las condiciones del CIAT una técnica de multiplicación desarrollada en las Filipinas, la cual utiliza esquejes de una sola hoja para multiplicar rápidamente materiales a partir de unos pocos cultivos de meristemas importados (ver discusión en la sección de este informe correspondiente a Agronomía).

Debido a su condición libre de enfermedades, los cultivos de meristemas se pueden utilizar no solamente para distribuir material de yuca a otros países, sino también para enriquecer el banco de germoplasma del CIAT con nuevas introducciones. Este método de transferencia de germoplasma suministra un medio adecuado para minimizar los riesgos de diseminación que existen cuando se transportan estacas de yuca.

La transferencia a Colombia de las colecciones de yuca de Perú y Brasil, que antes no era permitida a causa de la presencia de la roya del café en dichos países, fue posible mediante arreglos que se hicieron con las autoridades de sanidad vegetal del país, aplicando la técnica de cultivos de meristemas; así, en forma de cultivos meristemáticos estériles, se introdujeron al CIAT casi 200 variedades de yuca procedentes de Perú y Brasil en diciembre de 1979 y octubre de 1980, respectivamente (Figura 3).

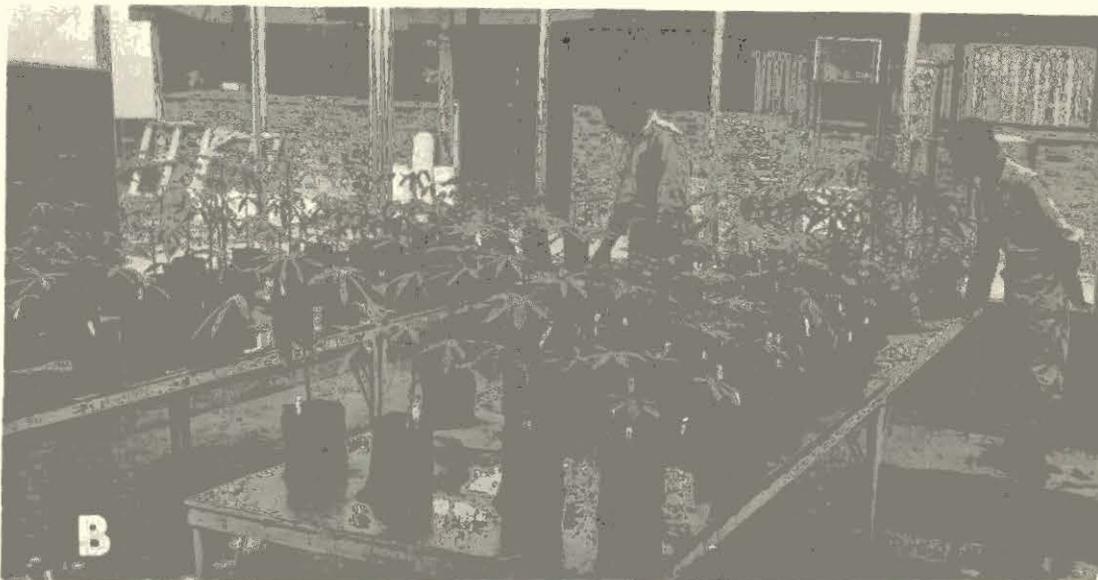


Figura 3. A. Mediante el método de cultivo de meristemas, en este sencillo paquete (45 x 25 x 24 cm) se trajeron al CIAT más de 130 variedades de yuca desde Brasil. B. En este invernadero se mantienen plantas derivadas de cultivos de meristemas procedentes de Perú, antes de ser incorporadas a la colección del CIAT.

Cuadro 2. Distribución de cultivos de meristemas de yuca desde CIAT hacia varias localidades en el sureste de Asia.

Destino	Método de envío	No. de tubos/ No. de variedades	Duración del viaje (días)	Estado del cultivo al arribo	Exito después del arribo (%) <sup>1</sup>	
					Recuperación	Propagación
Tailandia	1. Llevado a mano <sup>2</sup>	16/8	10	bueno	65	75
	2. correo aéreo	8/4	30	decolorado, café	85	85
	3. llevado a mano	4/2	8	bueno	90	-
Malasia	1. Llevado a mano <sup>2</sup>	18/9	7	bueno	70	70
	2. correo aéreo a Kew Gardens, UK	10/2	10	bueno	-	-
	de Kew Gardens a Malaysia	10/2	15	decolorado	95	-
Filipinas	1. Llevado a mano <sup>2</sup>	8/8	8	bueno	45	80
	2. correo aéreo	4/2	25	decolorado, café	50	-
Sri Lanka	1. Llevado a mano <sup>2</sup>	9/9	8	verde pálido	60	-
Indonesia	1. Llevado a mano <sup>2</sup>	8/8	10	verde pálido	70	-

<sup>1</sup> Exito estimado de acuerdo con la información recibida de los becarios.

<sup>2</sup> Cultivos preparados y llevados por los becarios que asistieron al curso en CIAT en Noviembre de 1979.

## Otros Sistemas de Cultivo de Tejidos en Yuca

**Cultivos de anteras.** Las microsporas, que son un producto de la meiosis, son células haploides que en condiciones adecuadas pueden llevar a cabo una función completamente nueva como es la de desarrollar tejidos y plantas en vez de gametos masculinos. El número de especies que se han sometido a la androgénesis es considerable; sin embargo, todavía no se han obtenido resultados con la yuca.

Mediante una beca de adiestramiento en el CIAT, se ha iniciado una investigación en cultivo de anteras. Hasta ahora se ha observado una fuerte influencia varietal en el desarrollo de estructuras macroscópicas (por ejemplo, formación de callos) en cultivos de anteras, como una respuesta a los factores del medio. Se están adelantando trabajos para averiguar las condiciones conducentes a la organogénesis en cultivos de callos provenientes de anteras.

Aunque las técnicas están todavía en su infancia, la incorporación de haploides en los programas específicos de mejoramiento de yuca puede ser útil, puesto que los genes en estos materiales segregan en proporciones más bien gaméticas que zigóticas; además, esos genes se podrían encadenar a la fusión somática y actuarían de

acuerdo con los esquemas del mejoramiento genético convencional. Un posible uso práctico de los haploides puede ser la producción de semillas híbridas F<sub>1</sub> de yuca.

**Cultivos de protoplastos<sup>1</sup>.** Existe actualmente la capacidad para generar plantas a partir de células para un número limitado de especies. Esta nueva tecnología puede ayudar en la identificación, montaje, recombinación y selección de formas nuevas de variabilidad genética.

Con el apoyo de una donación de la Fundación Rockefeller al Dr. J. Shepard, los Dres. E. Shanhin y D. Bidney realizaron en la Universidad del Estado de Kansas, Kansas, U.S.A., investigaciones que comprenden el aislamiento enzimático de gran número de protoplastos o células sin sus paredes, a partir de las hojas de yuca, y la incubación de estos protoplastos en un medio de formulación compleja; los protoplastos sufren una serie de divisiones celulares para formar colonias multicelulares y tejidos no organizados de callos.

<sup>1</sup> Aunque esta investigación no se realizó en el CIAT, se registra en el presente informe porque se relaciona directamente con trabajos sobre el cultivo de tejidos hechos en el CIAT. El Centro colabora suministrando materiales seleccionados y a través de discusiones con los conductores de este trabajo, sobre la orientación y metodología de la investigación.

Se ha observado un desarrollo ocasional de retoños al ensayar varios medios adicionales y se adelantan trabajos para definir las condiciones adecuadas para la regeneración de plantas.

Aunque en escala limitada, el Dr. R. Litz también inició un trabajo similar en el Centro Agrícola y de Investigación de la Universidad de Florida.

Usando cultivos de callos inducidos en varios tipos de tejidos, los Dres. G.G. Henshaw y J. Stamp están trabajando con una donación del ODM Británico, en la Universidad de Birmingham, Inglaterra. Aquí se pone atención a aquellas condiciones de cultivo que favorecen el desarrollo de "nódulos" meristemáticos en la masa de callos. El trabajo posterior daría énfasis al uso de tejidos embrionarios y regímenes secuenciales de cultivos.

El CIAT ha suministrado materiales seleccionados para uso en los estudios mencionados arriba.

### **Conservación mediante Congelación<sup>1</sup>**

Se continúan las investigaciones en Saskatoon, Canada (Dr. K. Kartha) y Birmingham, Inglaterra (Dres. G.G. Henshaw y J. O'Hara) para almacenar meristemas de yuca en nitrógeno líquido (-196°C). En ambos laboratorios, los cultivos de meristemas sometidos a una serie de protocolos de congelación-deshielo han mostrado baja supervivencia con formación de callos; sin embargo, todavía no se ha obtenido organogénesis de las células de callos.

---

<sup>1</sup> Aunque esta investigación no se realizó en el CIAT, se registra en el presente informe porque se relaciona directamente con trabajos sobre el cultivo de tejidos hechos en el CIAT. El Centro colabora suministrando materiales seleccionados y a través de discusiones con los conductores de este trabajo, sobre la orientación y metodología de la investigación.