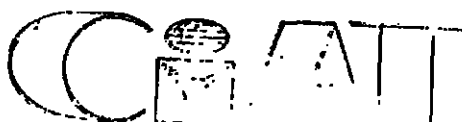


SEMINARIOS INTERNOS



Serie SE-07-80
Mayo 9, 1980



CENTRO DE DOCUMENTACION

CULTIVO DE TEJIDOS EN YUCA

W. M. Roca¹

FILMADO

RESUMEN

El cultivo de tejidos de plantas cubre un rango grande de técnicas: cultivo de protoplastos, células, anteras, callos, meristemas y órganos, teniendo todos un factor común: crecimiento de material vegetal en un ambiente aséptico como es el medio de cultivo esterilizado en tubos de ensayo.

Sólo las dos últimas décadas han sido testigos del mayor progreso en cuanto a la utilización de cultivo de tejidos para la investigación básica y aplicada en agricultura, horticultura y la industria. A pesar que varias de las técnicas todavía no se aplican en amplia escala, es posible propagar muchas especies por medio del cultivo de meristemas apicales, eliminar virus de materiales infectados y recientemente es factible utilizar el cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma.

Estas aplicaciones son particularmente útiles en cultivos de propagación vegetativa como la yuca por las siguientes razones: 1. Transmisión de patógenos sistémicos de una generación

1. Fisiólogo, Unidad de Recursos Genéticos - CIAT

a otra; 2. Altos costos de mantenimiento de colecciones de germoplasma; 3. Restricciones en el movimiento de materiales vegetales por motivos cuarentenarios; 4. Baja tasa de propagación asexual.

CULTIVO DE MERISTEMAS EN YUCA

Factores que influyen en el cultivo de meristemas de yuca:

1. Variedad
2. Composición del medio de cultivo
3. Factores ambientales de la incubación

Se realizaron trabajos iniciales para desarrollar una técnica de cultivo de meristemas capaz de ser usada consistentemente con un gran número de variedades de yuca. La técnica comprende dos fases: 1. Iniciación, que resulta en la formación de una yema con una o más hojitas (la mayoría de las variedades no enraizan en esta fase). El medio de cultivo está compuesto por los macro y micro nutrientes minerales de Murashige-Skoog, suplementado con sucrosa, vitaminas y niveles bajos de benziloaminopurina, ácido giberélico y ácido naftaleno acético. La adición de una fuente de aminoácidos es necesaria para el crecimiento de algunas variedades. 2. Enraizamiento, se consigue al transferir las yemas diferenciadas en la fase 1 al medio de Murashige-Skoog (diluído 3 veces) conteniendo mayor porcentaje de sucrosa y baja concentración de citoquinina. El 100% de las variedades forman raíces en este medio.

Otros factores que influyen en el cultivo de meristemas son: temperatura, iluminación y humedad relativa durante la incubación de los cultivos así como en la transferencia de las plantas a

potes y al campo.

Más de 120 variedades de yuca han sido procesadas por medio de esta técnica.

Cultivos meristemáticos de tallos múltiples:

Se ha desarrollado una técnica de micropropagación rápida de la yuca por medio de los cultivos de tallos múltiples.

El método consiste en la formación de cultivos conteniendo muchos nudos (cultivos en roseta), cada uno de los cuales lleva una yema axilar incipiente. La Tabla 1, muestra el efecto de la concentración de benziloaminopurina en la formación de cultivos en roseta. Para que las yemas axilares, así diferenciadas, puedan crecer y formar tallos, es necesario reducir la concentración de benziloaminopurina; esto ocurre mejor en medio líquido rotatorio. Una vez establecido el cultivo de tallos múltiples, es posible "cosechar" 10-15 tallos al mes por cada meristema. Cada uno de estos tallos contiene por lo menos 2 yemas, las cuales se cortan y se enraizan para producir 20-30 plantas.

La propagación de la yuca por cultivo de meristemas es utilizada para:

1. Erradicación de virus
2. Conservación de germoplasma
3. Intercambio de germoplasma
4. Multiplicación rápida

ERRADICACION DE VIRUS

Desde que se demostró que las células del meristema apical

de plantas infectadas con virus generalmente se encuentran libres de virus, la técnica de cultivo de meristemas ha sido usada para la erradicación de virus.

El proceso de control de enfermedades virales por medio del cultivo de meristemas, comprende las siguientes etapas:

1. Identificación del agente causal;
2. Aplicación de la técnica de erradicación;
3. Indexado de las plantas resultantes;
4. Propagación del material libre de virus.

La erradicación de virus es un proceso complejo, el cual depende de varios factores, entre ellos: condiciones de crecimientos de las plantas infectadas, la variedad y su interacción con el virus, la técnica de aislamiento y el cultivo de meristemas, y las pruebas de indexado.

Puesto que los virus dependen del metabolismo celular para su propia multiplicación, cualquier factor que afecte el metabolismo de la planta se espera que también afecte a la multiplicación de virus en el huésped.

El tratamiento de tejidos y plantas con temperaturas altas permite obtener mayores tasas de erradicación de virus por cultivo de meristemas. Parece que el calor (35°-40°C) favorece la inactivación, en contraste a la síntesis, viral así como retarda la translocación de virus en la planta, de tal forma que la región sin virus del meristema apical aumenta de tamaño y por lo tanto la eliminación de virus se facilita.

Erradicación del Mosaico de la Yuca:

Los síntomas de mosaico (posiblemente mosaico común de la yuca) de la var. Secundina desaparecieron en las hojas nuevas al tratar las plantas a 35°C por 8-10 días. Los síntomas re-aparecieron al llevar las plantas al invernadero por 5-6 días. El

mosaico se erradicó después de cultivar meristemas de plantas tratadas a 40°C (día) y 35°C (noche) por 3 semanas (Fig. 1).

Erradicación de Cuero de Sapo en la Yuca

Aunque todavía se desconoce la naturaleza exacta de esta enfermedad, existen indicaciones de que puede ser causada por un organismo de tipo viral. Varios factores influyen en la erradicación de cuero de sapo por cultivo de meristemas: termoterapia de las plantas infectadas, tamaño del meristema y la variedad.

La Tabla 2 demuestra que el porcentaje de plantas libre de síntomas es más alto cuando se cortan meristemas pequeños que grandes. Sin embargo, en el segundo ciclo de crecimiento a partir de estacas de plantas que no mostraron síntomas, las tasas de erradicación disminuyen a menos que las plantas infectadas hayan sido tratadas con altas temperaturas 40°C (día) y 35°C (noche) previamente al cultivo de meristemas. Algunas variedades (ej. M. Col 33, Quilcace) son obviamente más difíciles de limpiar que otras. Se encontró también que la duración de la termoterapia debe ser de 2-3 semanas ya que por debajo de 2 semanas, el porcentaje de eliminación disminuye significativamente. La no re-aparición de los síntomas de cuero de sapo en numerosas variedades crecidas por un segundo ciclo, hasta en un 100%, indicaría que la enfermedad ha sido erradicada.

La técnica desarrollada permite procesar de 30-40 variedades de yuca al mes. La evaluación de la erradicación se basa en la sintomatología de las raíces después de 4-5 meses de crecimiento en el campo.

Se ha iniciado un programa de limpieza clonal de la yuca, el cual ha empezado con variedades importantes e híbridos

promisorios y seguido por los materiales del banco de germoplasma.

Cerca de 50 variedades ya han sido limpiadas de cuero de sapo y otras 80 se encuentran en las últimas fases del proceso.

CONSERVACION DE GERMOPLASMA

El germoplasma de yuca puede ser conservado como semilla sexual y en forma de plantación vegetativa en el campo. Para conservar los caracteres varietales de la yuca, es necesario usar los órganos vegetativos.

La conservación convencional de la yuca por cultivos continuos en el campo demanda altos costos y expone a los materiales al ataque de pestes y enfermedades, a daños causados por el clima, etc.

La alta tasa de propagación que se puede obtener, además de encontrarse libres de micro-organismos y de requerir un pequeño espacio, hace factible la utilización del cultivo de meristemas para la conservación clonal de la yuca.

Los métodos de conservación por cultivos de tejidos deben garantizar pérdidas mínimas y alta estabilidad genética de las variedades. Los cultivos de tejidos de origen somático (no meristemático) y germinal con frecuencia muestran inestabilidad, dando lugar a variantes citogenéticos. Por el contrario, los cultivos de meristemas son altamente estables.

Métodos de conservación:

1. Conservación en temperatura ultrabaja.
2. Conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo.

1. Conservación en temperatura ultrabaja (N₂ - líquido).

A la temperatura de nitrógeno líquido (-196°C) las actividades metabólicas de las células se encuentran totalmente inhibidas, por lo tanto el peligro de variación genética en los cultivos es mínimo.

Estos estudios se realizan, en colaboración con el CIAT, en dos lugares: Saskatoon, Canadá y Birmingham, Inglaterra. Resultados iniciales demuestran que los meristemas de yuca pierden la capacidad de regenerar plantas después de haberlos mantenido en nitrógeno líquido durante tiempos cortos. Las células meristemáticas sufren daño más o menos masivo debido a: alta concentración osmótica, la deshidratación y la formación de cristales de hielo durante el enfriamiento. Parece que la temperatura crítica en la cual los cristales del hielo crecen más rápidamente es de cero a -60°C. El enfriamiento rápido podría evitar el crecimiento de los cristales de hielo. La adición al medio de cultivo de agentes protectores del congelamiento, como glicerol, DMSO, sucrosa, etc. previene el daño excesivo causado por el enfriamiento a temperaturas ultrabajas.

Entre otros factores que se están estudiando tenemos: la velocidad de enfriamiento y de des-congelamiento, la aclimatación de los tejidos, etc.

2. Conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo:

Este método consiste en mantener los cultivos a una tasa de crecimiento tan baja que el intervalo de transferencia a medios frescos sea lo más largo posible. La ventaja de este método es que se asegura la viabilidad de los materiales, siendo de fácil recuperación y propagación.

Los factores: temperatura, y la composición del medio de

cultivo influyen en la conservación de los cultivos meristemáticos.

La Figura 2 demuestra que cultivos mantenidos a 30°C (día) y 25°C (noche) crecen rápidamente durante los tres primeros meses para luego reducir su tasa de crecimiento, perdiendo viabilidad en el sexto mes. Sin embargo, a la temperatura de 20-22°C, el crecimiento de los cultivos se mantiene a una tasa baja durante 15 meses de conservación, permitiendo alta viabilidad.

La temperatura de conservación interacciona con factores del medio de cultivo. Mayor viabilidad se logró en medios conteniendo baja concentración de sucrosa y alta citoquinina o vice versa, en medios con alta sucrosa y baja citoquinina.

La conservación de la yuca en forma de cultivos meristemáticos de tallos múltiples ofrece la ventaja de aumentar la cantidad de material que se conserva por unidad de superficie. Este método consiste primero en inducir los cultivos en roseta y luego transferirlos al medio de conservación.

Los resultados de este trabajo sugieren que el intervalo de transferencia de los cultivos puede ser extendido por lo menos a dos años. Al final de este período, se cortan yemas de los cultivos para re-iniciar el ciclo de conservación. El objetivo es establecer un banco de cultivos meristemáticos de yuca; por lo menos 2,000 variedades pueden ser mantenidas en un cuarto de 20 m² conteniendo \pm 40 m² de estantería.

INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA

Debido a su limpieza de micro-organismos, los cultivos de meristemas pueden ser usados para el intercambio internacional de recursos genéticos, aliviándose así las restricciones cuarentenarias existentes para cultivos de propagación vegetativa como

la yuca. Los cultivos meristemáticos, por su condición aséptica, deben estar libres de insectos, nematodos, hongos y bacterias. En el caso de virus, los cultivos se iniciarán a partir de plantas libres de virus.

Se ha desarrollado un método para el movimiento de materiales de yuca en forma de cultivos meristemáticos. Este método se está usando tanto para distribuir variedades del CIAT a otros países como, para la introducción de germoplasma nuevo al CIAT. El método consta de los siguientes pasos:

1. Preparación de los cultivos de meristemas: ápices y plántulas.
2. Empaque y envío de los cultivos.
3. Manejo en el país recipiente: - recuperación de los cultivos
- Propagación
- Re-distribución

Utilizando estos métodos se han realizado envíos de cultivos a Brasil y a varios países de Asia del Sur.

Igualmente se ha introducido germoplasma nuevo al CIAT desde el Perú y de la zona Amazónica de Colombia. Se hará lo mismo desde Brasil.

El objetivo es crear una red de instituciones en América y Asia para el intercambio de germoplasma de yuca sin los riesgos de diseminación de plagas y enfermedades.

PROPAGACION

La transferencia de yuca del CIAT en forma de cultivos meristemáticos requiere que los materiales sean rápidamente multiplicados después de su arribo a los países recipientes. Es necesario que esta propagación se realice en lo posible bajo

condiciones libre de enfermedades.

1. Cultivo de Tallos Múltiples

El potencial de propagación de los cultivos de tallos múltiples es grande: a partir de una estaca de 10-15 cm es posible obtener 10 meristemas y éstos pueden producir aproximadamente 2,400 plantas en un año. El uso de mayor número de estacas aumentará el número de plantas por año. Cada una de estas plantas pueden a su vez producir 20-30 estacas para la siembra al año.

En algunas circunstancias será necesario utilizar técnicas más convencionales de propagación. El método de propagación rápida de la yuca desarrollado en el CIAT puede ser una alternativa válida. Otra técnica, recientemente desarrollada en Filipinas, también ofrece alto potencial de multiplicación según pruebas realizadas recientemente en el CIAT. Esta técnica utiliza esquejes de una sola hoja con su yema; por lo tanto es posible producir tantas plantas como hojas tenga la planta madre.

2. Multiplicación por esquejes de una sola hoja-yema

Conservadoramente, el potencial del método sería el siguiente:

1. Se pueden obtener por lo menos 100 esquejes de una sola hoja a partir de una planta madre de 4-5 meses de edad. En 15-18 días, se tendrán 100 plantas listas para su transplante al campo o al invernadero.
2. En aproximadamente 5 meses, se tendrán otras 100 plantas madres, cada una con aproximadamente 100 hojas. En 15-18 días más, se producirán $100 \times 100 = 10,000$ plantas listas para ir al campo.
3. Estas plantas en un año producirán $10,000 \times 30 = 300,000$

estacas para siembra comercial.

4. Si se envían un mínimo de 10 cultivos meristemáticos al país recipiente será potencialmente posible, usando la técnica de esquejes de una sola hoja, producir aproximadamente tres millones de estacas para la siembra.

OTRAS TECNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS EN YUCA

Por acción de concentraciones altas de auxinas (2,4-D o ANA), las células diferenciadas de la planta de yuca son estimuladas a re-diferenciarse y proliferar formando callos in vitro. Sin embargo, las técnicas para re-diferenciar plantas a partir de los callos todavía no se ha desarrollado.

La regeneración de plantas de yuca a partir de células y callos es un requisito para la utilización potencial de otras técnicas, tales como: cultivo de protoplastos y cultivo de anteras.

Cultivo de Protoplastos

- a. Poblaciones grandes de protoplastos podrían cultivarse in vitro y seleccionar variantes espontáneos o inducidos los que puedan resultar en plantas con atributos deseables.
- b. Lograr hibridaciones, que resulten imposibles por la vía sexual, por medio de la fusión de protoplastos. La propagación vegetativa de los materiales producidos usando estos métodos evitaría cualquier problema en caso de ocurrir esterilidad y/o variaciones no genéticas.

Se han iniciado proyectos en colaboración con el CIAT, para trabajar con el cultivo de protoplastos de yuca en las Universidades del Estado de Florida y del Estado de Kansas.

Cultivo de Anteras

El cultivo de anteras podría ser utilizado, por ejemplo, para producir plantas haploides y líneas puras a partir de materiales seleccionados; las líneas podrían cruzarse una con otra y así dar origen a híbridos F_1 con alto grado de heterosis. Estos híbridos podrían usarse como cultivares y cuantenerse vegetativamente o se podría producir nueva semilla F_1 haciendo la cruce entre las líneas puras.

TABLA 1. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE BAP EN EL
DESARROLLO DE MERISTEMAS DE YUCA IN VITRO
(cv. CM 391-2)

| | BAP* mg/l | No. nudos por tallo | Longitud de entrenudos (cm) | Formación de** | |
|----|--------------|------------------------|--------------------------------|----------------|-------|
| | | | | raíz | callo |
| 1. | 0.05 | 4 | 1.0 | ++ | + - |
| 2. | 0.1 | 8 | 0.5 | + | + |
| 3. | 0.2 | 11 | 0.3 | - | + |
| 4. | 0.5 | 12 | 0.2 | - | + |
| 5. | 1.0 | 11 | 0.1 | - | ++ |
| 6. | 2.0 | 7 | 0.1 | - | +++ |
| 7. | 4.0 | 3 | 0.1 | - | +++ |

* BAP (benzilaminopurina) fué suplementado al medio de Murashige-Skoog + 2% Sucrosa + 0.01 mg/l NAA.

** Cantidad relativa de raices y callos.
Datos representan el promedio de cuatro cultivos.

FIGURA 1. CONTROL TERMICO DE LA APARICION DE SINTOMAS DE MOSAICO EN PLANTAS DE YUCA (cv. SECUNDINA) Y SU ERRADICACION POR MEDIO DE CULTIVO DE MERISTEMAS

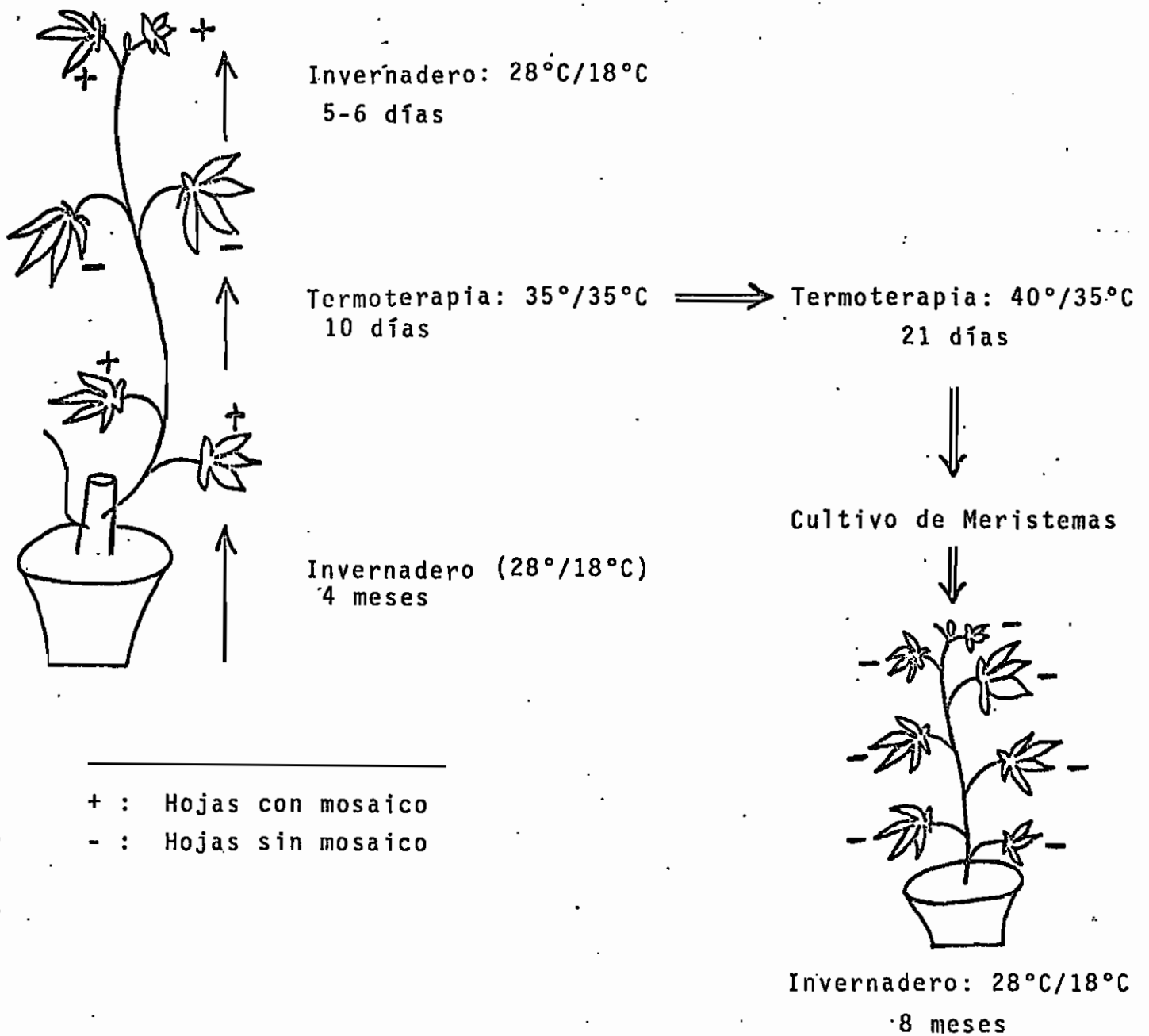


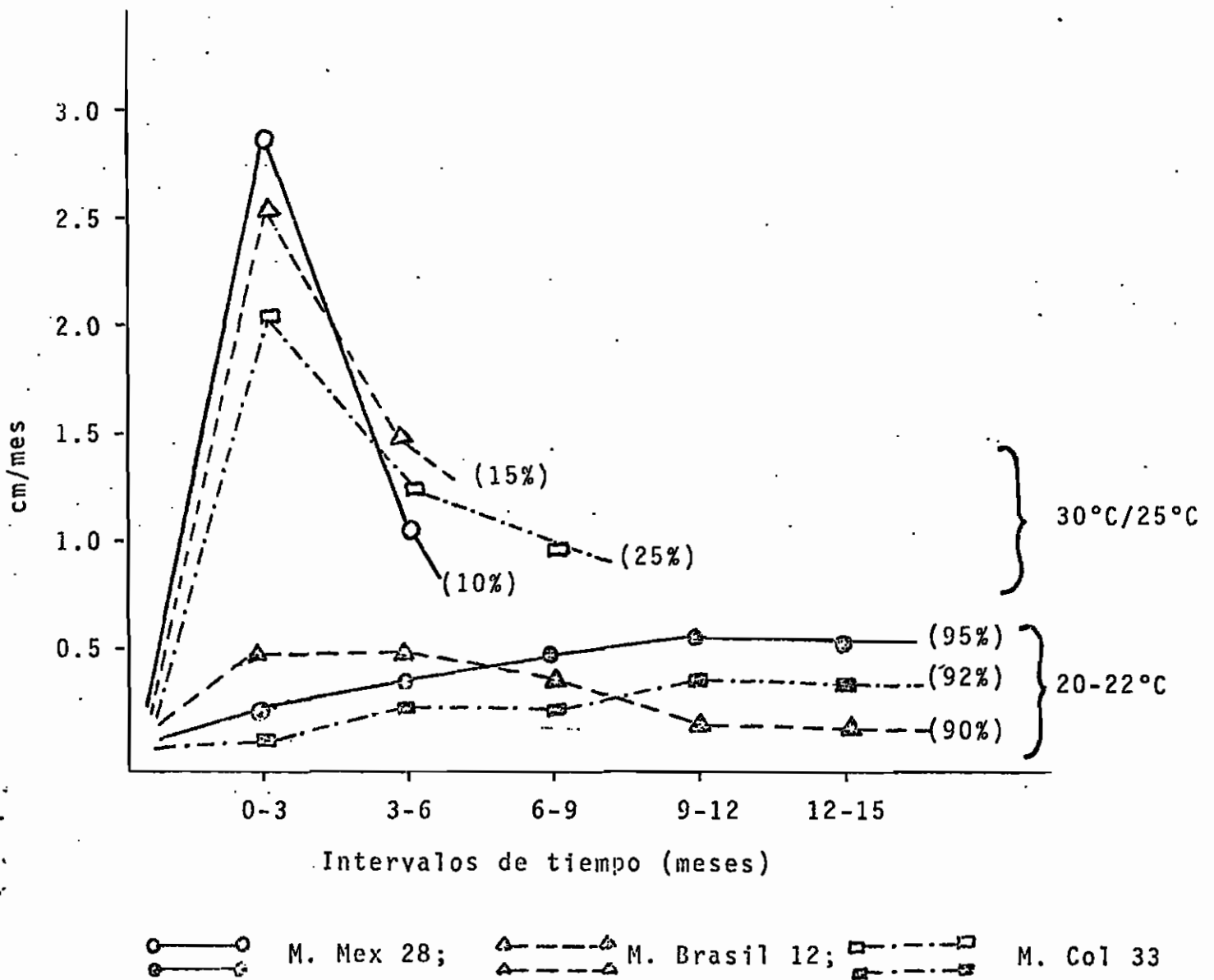
TABLA 2. ERRADICACION DE CUERO DE SAPO POR CULTIVO DE MERISTEMAS

| <u>Variedad</u> | <u>Tratamiento de estacas</u> | <u>Tamaño del meristema</u> | <u>% Plantas libre de Síntomas*</u> | |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| | | | <u>1er Ciclo</u> | <u>2° Ciclo</u> |
| M. Col 33 | Ninguno | Pequeño | 92 | 85 |
| | | Grande | 35 | 6 |
| | Termoterapia | Pequeño | 96 | 95 |
| | | Grande | 60 | 15 |
| M. Col 2 | Ninguno | Pequeño | 100 | 95 |
| | | Grande | 86 | 22 |
| | Termoterapia | Pequeño | 100 | 100 |
| | | Grande | 79 | 20 |
| M. Col 33** | - | - | 0 | 0 |

* Las plantas del 1^{er} ciclo se derivaron directamente de meristemas; las del 2° ciclo, se derivaron de estacas cortadas de las plantas sin síntomas del 1^{er} ciclo.
Duración de cada ciclo = 5 meses en el campo.

** Plantas derivadas de estacas sin tratamiento de calor y sin cultivo de meristemas.

FIGURA 2. CONSERVACION DE LA YUCA COMO CULTIVOS MERISTEMATICOS:
TASAS DE CRECIMIENTO¹ DE LOS CULTIVOS DURANTE PERIO-
DOS DE CONSERVACION



1. Promedios de 4-5 cultivos.

El % de viabilidad se presenta en paréntesis.