

Cultivo de Tejidos

En 1981, continuaron los esfuerzos para utilizar los métodos del cultivo de meristemas para limpiar materiales de enfermedades, desarrollar una colección de germoplasma in vitro e intercambiar materiales clonales con varios países. También se adelantó investigación para refinar las técnicas actuales e iniciar métodos de cultivo de anteras y células.

Cultivo de Meristemas

Recuperaciones de clones sanos

Termoterapia. Las tasas de "limpieza" de cuero de sapo y mosaicos son altas cuando las estacas infectadas rebrotan a altas temperaturas antes de tomar los cultivos de meristemas (CIAT, Informes Anuales, 1979 y 1980). Un punto de importancia práctica es el grado en el que la termoterapia por sí misma afecta la transmisión del cuero de sapo de estacas infectadas a sus retoños durante el rebrote. Cortes de diferentes longitudes fueron hechos en retoños que brotaron de estacas mantenidas durante tres semanas a temperaturas de 40°C durante el día y 35°C durante la noche; las estacas testigo se cultivaron en el invernadero. Los retoños enraizaron y se transplantaron al campo. A pesar de que la temperatura alta redujo en gran medida la severidad de los síntomas del cuero de sapo, el número de plantas completamente libres de síntomas fue relativamente pequeño (Cuadro 1). Esto mostró que la termoterapia no previno completamente la transmisión de la enfermedad de las estacas infectadas a los retoños. La temperatura alta solamente retrasó el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, especialmente en plantas cultivadas a partir de las estacas cortas y probablemente disminuyó la tasa de movimiento ascendente del agente causal.

Termoterapia seguida por cultivo de meristemas. El cultivo de meristemas obtenidos de estacas tratadas a altas temperaturas no solamente aumenta la tasa de "limpieza" del cuero de sapo sino también aumenta el porcentaje de meristemas que inician crecimiento en forma exitosa. Los resultados preliminares de un trabajo de investigación de tesis indican que este último efecto de la termoterapia ocurre incluso durante el cultivo de meristemas de variedades de yuca que no muestran síntomas obvios de la enfermedad. Al igual que en otros cultivos, la pérdida de vigor y, por consiguiente, la reducción del crecimiento de los cultivos, se puede deber a la acumulación de factores de tipo viral en variedades "viejas". Para probar en forma indirecta si este es el caso y, además, para evaluar las posibles reducciones en el rendimiento potencial, se están adelantando trabajos mediante el uso de dos variedades de yuca propagadas por cultivos de meristemas con y sin termoterapia y propagadas mediante estacas.

Cuadro 1. Sintomatología de raíces y plantas libres de síntomas originados de retoños provenientes de estacas infectadas con cuero de sapo que rebrotaron en condiciones de termoterapia.

Material	Termoterapia (40/35°C) ^a		Testigos (invernaderos)	
	Plantas libres de síntomas	Grado de síntomas ^b	Plantas libres de síntomas	Grados de síntomas ^b
M Col 33				
retoños de 4 - 5 cm	1/9	0	0/5	3
retoños de 8 - 10 cm	1/10	1	0/6	3
M Col 2062				
retoños de 4 - 5 cm	1/10	1	0/5	4
retoños de 8 - 10 cm	0/10	2	0/5	4

- a. Termoterapia aplicada a estacas en materos durante 3 semanas en una cámara de crecimiento. Retoños enraizados cultivados en el campo durante cuatro meses. Longitud de los retoños medida del ápice hacia abajo.
- b. Grado relativo de síntomas: 0 = leves; 1-4 = grados crecientes de severidad.

Con base en los resultados presentados anteriormente y los experimentos de injertación de clones sanos en patrones enfermos (CIAT, Informe Anual, 1980), se puede deducir que el agente causal del cuero de sapo se transporta hasta muy cerca del ápice meristemático de los retoños; por lo tanto, es importante evaluar el efecto que puede tener el tamaño del meristema aislado en la erradicación del cuero de sapo.

Se tomaron estacas de plantas infectadas de seis variedades y se sembraron en materos y se expusieron a 35°C (día y noche) durante el rebrote; después de tres semanas, se aislaron y cultivaron los meristemas de dos tamaños. Las plantas recuperadas de los cultivos de meristemas se cultivaron en el campo y se propagaron por estacas durante varios ciclos consecutivos. El Cuadro 2 presenta un resumen de los resultados hasta el quinto ciclo de propagación vegetativa del trabajo iniciado dos años antes. El cultivo de meristemas pequeños produjo tasas de "limpieza" del 100% o cerca de este valor; además, los materiales permanecieron limpios durante varios ciclos de propagación. Sin embargo, el cultivo de meristemas grandes redujo las tasas iniciales y, en dos variedades, los síntomas de la enfermedad reaparecieron en 10 - 30% de las plantas después del tercer ciclo. Estos resultados indican que la termoterapia seguida por el cultivo de meristemas desempeña una función importante en la recuperación de clones sanos a partir de plantas enfermas con cuero de sapo; el cultivo de meristemas pequeños se debe combinar con la termoterapia de las estacas infectadas durante el rebrote.

Cuadro 2. Efecto del tamaño del meristemo en la tasa de "limpieza" del cuero de sapo mediante termoterapia seguida por cultivo de meristemas.

Variedad	Tamaño del meristema ^a	Plantas libres de síntomas (%) ^b				
		I Ciclo	II Ciclo	III Ciclo	IV Ciclo	V Ciclo
M Col 2	Pequeño	100	100	100	100	100
	Grande	88	100	100	100	100
M Col 33	Pequeño	96	100	100	100	100
	Grande	80	100	100	100	100
M Col 2062	Pequeño	82	100	100	100	100
	Grande	50	100	100	100	100
M CR3	Pequeño	100	100	100	100	100
	Grande	90	100	100	100	100
M Col 67	Pequeño	100	100	100	100	100
	Grande	90	100	80	90	85
M Col 73	Pequeño	100	100	100	100	100
	Grande	85	100	70	80	92

a. Pequeño = meristema apical con dos primordios (0.5 - 0.6 mm);
grande = meristema apical con cuatro primordios (0.8 - 1.0 mm).

b. Plantas de I ciclo cultivadas directamente a partir de cultivos de meristemas de plantas enfermas; plantas de II ciclo derivadas de estacas cortadas de plantas sin síntomas de I ciclo; plantas de III ciclo derivadas de estacas de plantas sin síntomas del II ciclo; etc. Duración de cada ciclo: 4-5 meses.

Programa rutinario de "limpieza" de enfermedades. En 1981 continuó el trabajo de rutina para limpiar los materiales de yuca de enfermedades peligrosas, especialmente el cuero de sapo. La técnica consiste básicamente en los siguientes pasos:

1. Las estacas que presentan yemas en dormancia se desinfectan, se siembran en materos y se someten a termoterapia (temperatura de 40°C durante el día y 35°C durante la noche) en cámaras de crecimiento con ambiente controlado. En estas condiciones, el rebrote ocurre en 1-2 semanas, pero el tratamiento continúa durante 2 semanas más.
2. Las yemas terminales de crecimiento aéreo se cortan y desinfectan.

3. Los meristemas pequeños (0.5-0.6 mm) se aíslan de las yemas en condiciones estériles y se siembran en el medio de cultivo.
4. Después de 4-5 semanas de incubación, los meristemas y nudos que han salido del meristema se cortan y se transfieren al medio de enraizamiento.
5. Las plántulas enraizadas se endurecen antes de sembrarlas en materos en el invernadero.
6. Las plantas en materos repetidas se transplantan al campo y a materos grandes en el invernadero.
7. Después de 3 meses de crecimiento, se evalúa la presencia del cuero de sapo en las plantas derivadas del cultivo de meristemas.
8. Se cortan estacas de las plantas libres de síntomas, se cultivan nuevamente durante tres meses, se reevalúan y finalmente se entregan a la respectiva sección del Programa de Yuca.

Como norma se mantienen muestras duplicadas de todo material limpio en condiciones estériles en la forma de cultivos de meristemas. El Cuadro 3 describe la clase de materiales, las enfermedades que se limpiaron y el número de variedades procesadas este año mediante la técnica de erradicación mencionada.

Conservación de germoplasma

La conservación de germoplasma es una actividad a largo plazo cuya meta final es construir un banco de germoplasma *in vitro*. El método de conservación de cultivos de meristemas proporciona las ventajas del aislamiento de material de microorganismos, el uso de un espacio reducido y costos menores. Este mantenimiento también debe facilitar el intercambio de materiales clonales. El Cuadro 4 muestra la fuente y la cantidad de materiales de yuca que han sido transformados a cultivos de meristemas para su conservación.

Intercambio internacional de germoplasma

La ventaja principal de la utilización de los cultivos de meristemas para intercambiar clones de yuca con otros países es la limpieza inherente de enfermedades peligrosas en este material. El éxito del procedimiento de intercambio depende de dos factores principales: el período de tiempo transcurrido desde el embarque hasta la llegada del material y la eficiencia del manejo de los cultivos después de que lleguen a su destino (CIAT, Informe Anual, 1980). Se han hecho trabajos para diseñar las condiciones que puedan reducir cualquier efecto negativo en los cultivos debido a viajes largos y mejorar los procedimientos de manejo al llegar a su destino.

Cuadro 3. Fuentes, enfermedades y cantidad de materiales limpios mediante la técnica del cultivo de meristemas.

Fuente del material	Enfermedad	No. de variedades
Llanos de Colombia	Sospecha de CBB	34
Santander de Quilichao	Cuero de sapo y posiblemente CBB	91
Banco de germoplasma del CIAT	Sospecha de cuero de sapo	54
Híbridos y variedades promisorias	-- ^a	21

a. Solamente limpieza preventiva; cerca de 1700 plantas se transplantaron al campo para su propagación.

Cuadro 4. Fuente y cantidad de material de yuca mantenido en la forma de cultivo de meristemas hasta octubre de 1981.

Fuente de materiales	No. de accesiones ^a
Brasil	272
Amazonía colombiana	117
Llanos colombianos	30
Perú	29
Variedades del CIAT M Col	157
Líneas híbridas del CIAT	33
Variedades del CIAT M Ven	14
Variedades del CIAT M Mex	10
Variedades del CIAT M Bra	10
Otras variedades del CIAT: Pan, Ecu, Cub, PR, etc.	30
Total	702

a. Repeticiones/accesiones = 3-5 tubos de ensayo.

Preparación de cultivos para su distribución. Los cultivos de meristemas de yuca expuestos a la oscuridad se alargan rápidamente y se tornan cloróticos; la oscuridad prolongada induce defoliación y oscurecimiento de las raíces y, eventualmente, de los retoños. A fin de averiguar si el medio de cultivo puede influir en el grado de tolerancia a la oscuridad durante el embarque, se prepararon cultivos de meristemas para su distribución en cuatro medios de composición variable y mantenidos en la oscuridad hasta por 6 semanas; se sacaron muestras repetidas cada semana y se evaluaron. El Cuadro 5 muestra que la composición del medio de cultivo influyó en la elongación de los entrenudos, hojas caídas y clorosis, como también en la ramificación y el enraizamiento de los cultivos. La elongación de los entrenudos, en

relación con la longitud inicial de los entrenudos antes del inicio del tratamiento, fue mínima cuando el medio contenía o la citoquinina BAP o la auxina 2,4-D; además, la defoliación fue mínima y la clorosis disminuyó cuando el medio contenía tanto la citoquinina como la auxina. Este trabajo ha confirmado observaciones anteriores con relación a la sensibilidad del cultivo de meristemas de yuca a una oscuridad prolongada (CIAT, Informe Anual, 1980) y ha demostrado que en el medio debe existir un juego completo de reguladores de crecimiento para minimizar los efectos de la oscuridad en detrimento de los cultivos.

Manejo de los cultivos al arribar a su destino. Especialmente después de viajes de más de dos semanas, los cultivos de yuca se deben tratar antes de su micropropagación y/o siembra en materos, con aproximadamente 3000 lux de iluminación y 24-25° durante 1-2 semanas. Este procedimiento de endurecimiento prepara a los cultivos para soportar una deshidratación excesiva durante su siembra en materos. Esta se debe hacer en invernadero bajo sombra, utilizando una mezcla 2:1 de arena y suelo; los materos con las plántulas se deben mantener en cámaras de plástico que proporcionen una alta humedad relativa durante 1-2 semanas.

Cuadro 5. Intercambio internacional de clones de yuca *in vitro*; efecto de la composición del medio en la elongación del tallo, caída de hojas y clorosis de plántulas derivadas de meristemas mantenidas en la oscuridad.^a

Párametro	Medio ^b	Duración de la oscuridad (semanas)		
		2	4	6
Elongación de los entrenudos (%) ^c	A	32	48	56
	B	0	6	10
	C	6	30	40
	D	35	62	70
Caída de hojas (%)	A	50	60	75
	B	40	47	96
	C	40	50	84
	D	20	24	55
Clorosis relativa ^d	A	1	2	4
	B	1	2	3
	C	1	2	4
	D	0	2	2

a. Promedio de tres variedades: 10 - 20 repeticiones/tratamiento.

b. A = 1/3 MS + 2% de sucrosa + 0.01 mg/l ANA; B = MS + 1% sucrosa + 0.1 mg/l BAP + 0.1 mg/l de AG; C = 1/3 MS + 2% sucrosa + 0.01 mg/l 2,4-D; D = MS + 1% sucrosa + 0.1 mg/l BAP + 0.1 mg/l de AG + 0.01 mg/l 2,4-D.

c. Elongación al final del tratamiento.

d. Calificación: 0 = verde amarillento; 1 a 4 indican rangos de clorosis desde un poco hasta muy clorótico.

Se ha iniciado el mejoramiento del crecimiento temprano de plántulas sembradas en materos derivadas de meristemas. A intervalos semanales se regaron plántulas recién sembradas en materos incluyendo varias dosis de fertilización con altos niveles de P (10-52-10, N-P-K) durante 5 semanas; el riego con una solución nutritiva de Hoagland y agua corriente se utilizaron como testigos. Como se ilustra en la Figura 1, en comparación con los testigos, hubo una respuesta marcada a la fertilización con alto nivel de P hasta una dosis de 2 g/litro. Hubo un aumento de 100 veces el peso fresco de la plántula original en el tubo de ensayo con la dosis óptima de P, en tanto que solamente se obtuvo un aumento de 2-5 veces con los testigos de agua corriente y solución nutritiva de Hoagland, respectivamente. El aumento del peso fresco estuvo acompañado por aumento en la elongación del tallo a razón de 3-4 cms/semana con el alto nivel de P en comparación con elongaciones de 0.5 a 1.0 cm/semana con los testigos. Concentraciones mayores de 2 g/litro de P presentan un efecto en detrimento del crecimiento.

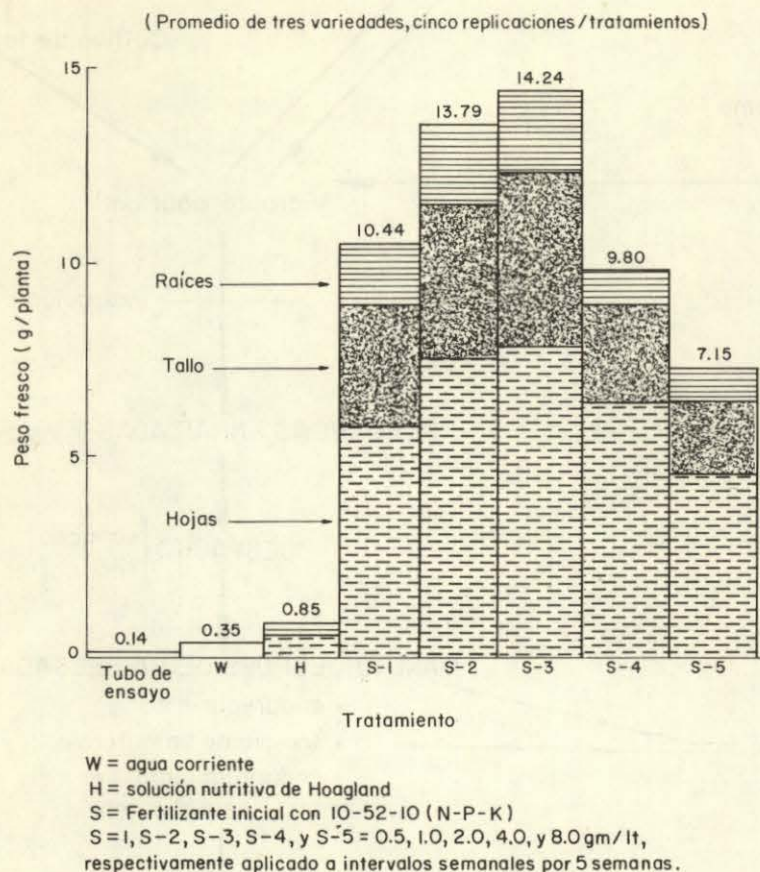


Figura 1. Acondicionamiento de los clones de yuca derivados de meristemas para su transplante al campo: Efecto de la fertilización con P en el crecimiento temprano de plantas obtenidas *in vitro* en condiciones de invernadero (promedio de tres variedades, cinco repeticiones/tratamiento).

Intercambio rutinario de clones de yuca en la forma de cultivo in vitro. El diagrama de flujo presentado en la Figura 2 muestra los principales pasos y procedimientos que se siguen en el intercambio de materiales de yuca en la forma de cultivos de meristemas.

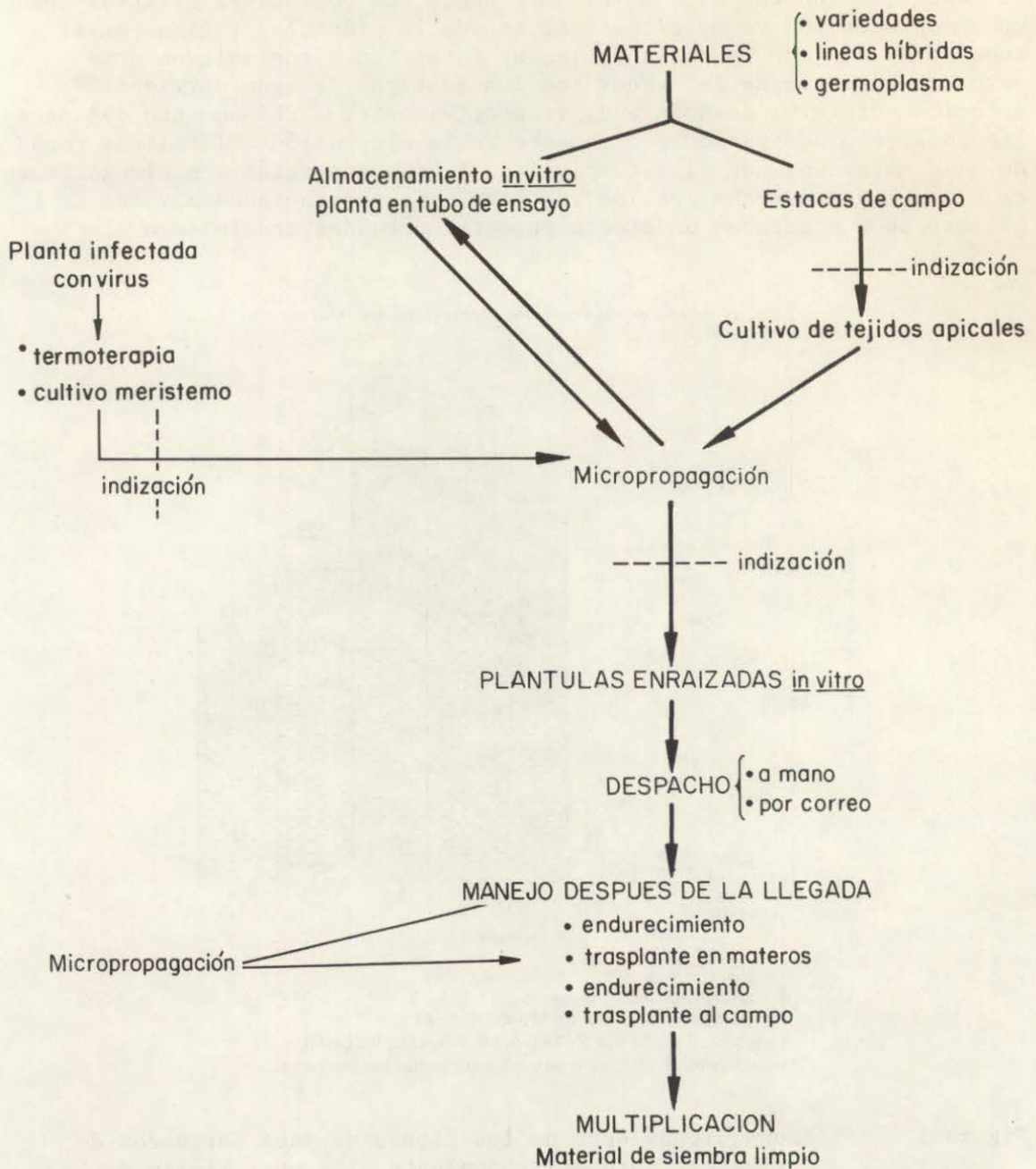


Figura 2. Diagrama de flujo que muestra el intercambio internacional de materiales clonales.

Distribución desde el CIAT. En 1981, el CIAT despachó in vitro a ocho países un total de 95 materiales de yuca en la forma de plántulas enraizadas derivadas de cultivos de meristemas (Cuadro 6). Con el fin de favorecer la capacidad de los programas nacionales para manejar los clones de yuca distribuidos en la forma de cultivos in vitro; se ofreció un curso corto de entrenamiento a técnicos de nueve países de América Latina.

Cuadro 6. Distribución de materiales de yuca en la forma de cultivos in vitro del CIAT a otros países.

País	Destino Institución	No. de materiales		
		Variedades	Líneas híbridas	Total
Brasil	CENARGEN/CNPMF	3	4	7
México	INIA	10	6	16
Cuba	CEMSA	13	4	17
Filipinas	Univ. Los Baños	1	2	3
China	South China Ac. Trop. Crops	4	3	7
Australia	Plant Quar. Res. Stat., Canberra	3	5	8
Africa del Sur	Anglo American Corp.	1	4	5
E. U.	USDA/IPRI	20	0	20
	USDA	4	1	5
	Univ. Arizona	7	0	7
Total		66	29	95

Introducciones al CIAT. Siguiendo metodologías establecidas anteriormente (CIAT, Informe Anual, 1980), se transfirieron más de 150 accesiones de yuca de Brasil al CIAT en la forma de cultivos de meristemas con la colaboración del CNPMF y CENARGEN, del Brasil. Al adicionar estos materiales, más los traídos de manera similar el año pasado, se puede indicar que la variabilidad de la yuca cultivada en la mayoría de las regiones de Brasil, excepto de la parte sur, está bien representada en la colección de germoplasma del CIAT. Se están haciendo trasplantes para transferir al CIAT muestras del sur del Brasil, las cuales pueden ser valiosas debido a su adaptación a condiciones de zonas templadas. De manera similar, becarios anteriores del CIAT del sureste asiático prepararon y despacharon al CIAT cuatro importantes variedades de yuca. Los materiales introducidos al CIAT en la forma de cultivos de meristemas se micropropagaron, se sembraron en materos y se trasplantaron al campo para su utilización por el Programa (Figura 3).

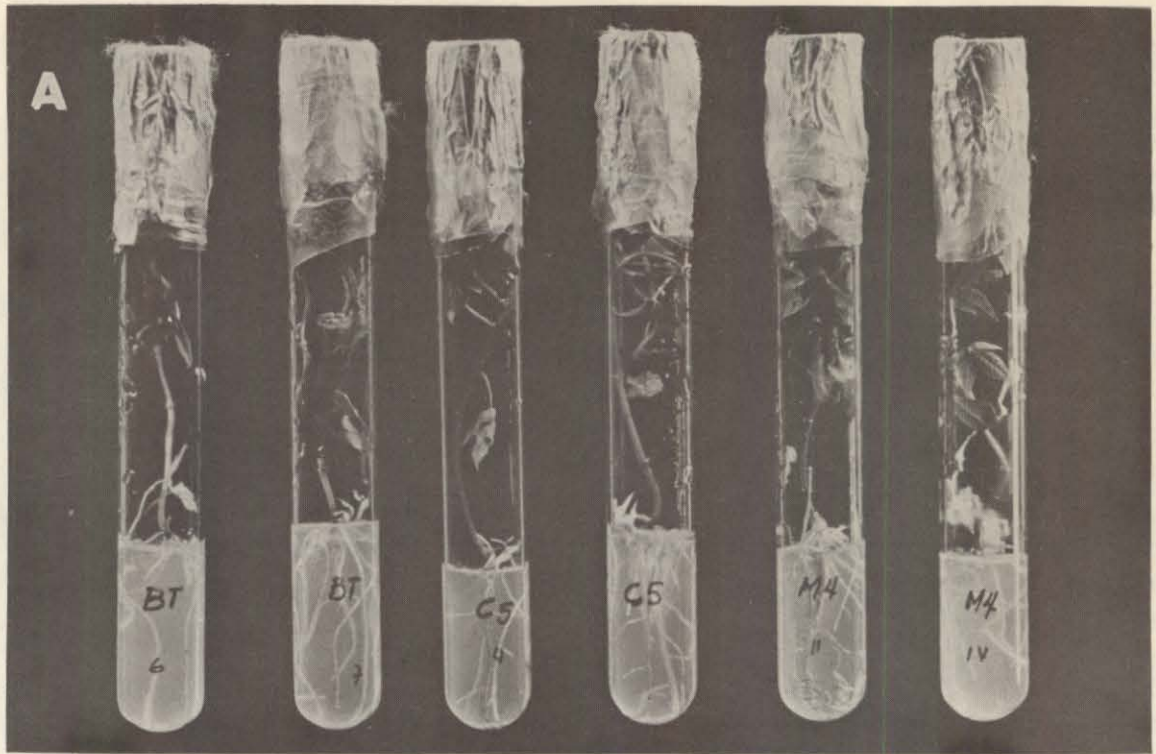


Figura 3. Introducción de materiales de yuca del sureste de Asia al CIAT en la forma de plántulas enraizadas derivadas de cultivos de meristemas. A = clones despachados por G. Wong (MARDI-Malasia) en tubos de ensayo. B = los mismos materiales después del transplante al campo.

Cultivos de Anteras

Para producir plantas haploides exitosas mediante el cultivo de anteras o microsporas, se consideran dos pasos importantes: (1) la inducción de la microspora para que cambie su destino sexual normal y siga una vía vegetativa, y (2) la diferenciación de los órganos o embriones y plantas de las microsporas inducidas. Este año se inició el trabajo encaminado a desarrollar métodos para el cultivo de anteras de yuca.

Estados de la microspora

Se ha determinado que existe una relación cercana entre la habilidad de la microspora para sufrir una multiplicación vegetativa de células en forma continuada y el estado de desarrollo al momento del aislamiento de la yema floral y el cultivo. Los trabajos con otros cultivos indican que la microspora uninucleada es el estado óptimo para la multiplicación de células.

Utilizando diversas variedades de yuca, se realizaron trabajos para observar los estados de la microsporogénesis con relación al tamaño de la yema floral; este trabajo tiene aplicación práctica directa en lo que respecta al muestreo de yemas y anteras para su cultivo en el estado adecuado de la microspora. Las yemas florales de 1-2 mm y 2-4 mm correspondieron a microsporas en los estados tetranucleados y uninucleados (temprano, intermedio y tardío), respectivamente; yemas más grandes contenían microsporas en su estado binucleado.

Con el fin de hacer observaciones citológicas adecuadas de las microsporas, se modificaron las microtécnicas convencionales para prevenir las interferencias debido a la presencia del latex y la exina.

Androgénesis

Se aislaron yemas florales de 2-4 mm de las anteras de seis variedades de yuca y se cultivaron. Ocurrió multiplicación de células en la mayoría de las anteras y en ellas se produjeron masas de callos; sin embargo, se observó una fuerte influencia de la variedad en la cantidad de crecimiento de callo. Los recuentos de cromosomas de tejidos apicales radicales, diferenciados en los callos, indicaron su haploidía. Continúan los trabajos para desarrollar las condiciones para una androgénesis completa.