

EL CULTIVO DE MERISTEMAS SU POTENCIAL EN CONSERVACION DE RECURSOS GENETICOS, EN INTERCAMBIO Y PROPAGACION DE GERMOPLASMA

W. Roca
M Roca**

Las colecciones de germoplasma de plantas son parte integral de cualquier programa de mejoramiento genético, por lo tanto la seguridad de su disponibilidad es vital en la producción vegetal para la alimentación y la industria

Muchas especies tropicales se conservan preferentemente por medio de la propagación vegetativa. Pero la conservación de germoplasma por medio de cultivos vegetativos en el campo es costosa y además aumenta la posibilidad de pérdidas como consecuencia del ataque de plagas y enfermedades, de cambios climáticos, etc

Con frecuencia los órganos vegetativos constituyen un medio de transmisión y diseminación de plagas y enfermedades, especialmente de aquellas que son causadas por organismos sistémicos. Por este motivo, el intercambio de plantas y partes de plantas entre regiones o países se encuentra restringido por regulaciones cuarentenarias

Progresos alcanzados en las aplicaciones de los métodos de cultivo de tejidos han hecho posible propagar un gran número de especies de importancia económica mediante el cultivo de meristemas. El método es particularmente atractivo porque permite obtener, con alta frecuencia, clones libres de patógenos a partir de plantas sistémicamente infectadas. Además, debido a su limpieza de micro-organismos, el requerimiento de pequeño espacio, a su alto potencial de propagación y a su manejo relativamente simple, el cultivo de meristemas puede ser utilizado para la conservación y el intercambio internacional de recursos genéticos

TECNICA PARA EL CULTIVO DE MERISTEMAS

El cultivo de meristemas consiste en aislar la región meristemática de la yema vegetativa (apical o lateral), juntamente con uno o dos de los primordios foliares más jóvenes, y transferirla a un medio estéril, el cual debe proporcionar al



** Fisiólogo, Unidad de Recursos Genéticos, CIAT, Apartado Aéreo 6713, Cali-Colombia

* Contribución para el Curso Internacional de Recursos Genéticos CATIE, Turrialba, Oct 1980

26 FEB 1981
51
91072

tejido las sustancias químicas y los regímenes de temperatura, luz y humedad apropiados para su crecimiento y desarrollo (Fig 1)

1 Material Vegetal

Las yemas en estado vegetativo y crecimiento activo son apropiadas como fuente de meristemas. Las yemas pueden ser apicales o axilares (ej camote, café, papa), pueden obtenerse de retoños de estacas (ej yuca, cacao), de brotes de tubérculos (ej yame, papa), de brotes de cormos (ej taro), de rizomas (ej banano), etc

En su estado natural los meristemas permanecen asépticos, sin embargo, es necesario desinfectar la porción de la planta que lleva la yema antes de proceder a extraer el meristema. La desinfección consiste en tratar las yemas con alcohol etílico al 70% seguido de una inmersión por 5-10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y de varias lavadas con agua destilada estéril.

2 Aislamiento del Meristema

El trabajo de aislamiento y explantación del meristema debe realizarse dentro del laboratorio, en una área lo más limpia posible. El uso de cabinas con flujo laminar de aire filtrado de microbios permite mantener la esterilidad.

Herramientas de trabajo un estereomicroscopio (10-50x), escalpelos No 11, pinzas, micro-cuchillas y agujas de disección.

Operación. Se coloca la yema, previamente desinfectada, en el campo visual del microscopio y con el escalpelo se cortan las hojas de la yema hasta llegar al meristema que mide de 0.2-0.4 mm y tiene la forma de cúpula, su punto terminal es brillante y está acompañado por uno o dos de los primordios foliares más jóvenes (Fig 2A). Usando la micro-cuchilla se corta el meristema y se lleva rápidamente a un tubo de ensayo que contiene el medio de cultivo. Para lograr un trabajo de alta calidad durante el aislamiento y explantación del meristema se debe mantener la esterilidad del material, prevenir la desecación de las estructuras suculentas de la yema y evitar daños físicos al meristema.

3 Incubación de los Cultivos

Los tubos de ensayo, conteniendo los meristemas, se colocan en un ambiente que proporcione condiciones de temperatura, luz y humedad controladas. La temperatura puede ser de 26-30°C (día) y 22-26°C (noche), la iluminación de 2,000-5,000 lux, un

fotoperíodo de 12-14 horas, y la humedad relativa de 75-85%

4. Desarrollo de los Meristemas

En condiciones de cultivo apropiadas el tallo se elonga y generalmente crecen las raíces en su región basal después que se ha desarrollado una pequeña cantidad de callo. En esta forma a partir del meristema explantado se produce una planta en miniatura en 4-5 semanas (Fig 2B y C).

Sin embargo, este patrón de crecimiento puede sufrir alteraciones por efecto de la variedad y de las condiciones químicas y físicas del cultivo. Por ejemplo, en trabajos realizados con un rango amplio de especies de papa (desde papas diploides hasta pentaploides) se encontró que, todas las especies estudiadas, a excepción de la subsp tuberosum, formaron uno o más tallos a partir de un meristema cuando el cultivo se hizo en dos etapas. La primera, de iniciación de los tallos, lo cual fué favorecido por niveles altos de citoquininas y la segunda, de crecimiento y proliferación de los tallos, favorecido por niveles bajos de citoquininas y altos de ácido giberélico, los tallos así formados se transfirieron a un medio de enraizamiento para la formación de plantas.

Igualmente, se encontró que la mayor diferencia en la respuesta de diferentes variedades de yuca al cultivo de sus meristemas se debió a su habilidad para formar raíces, siendo la formación de tallos menos influenciada por la variedad. Estos resultados motivaron el diseño de una técnica para el cultivo de meristemas de la yuca que consistió primero, en inducir la formación de tallos en un medio con niveles bajos (0.05 mg/l) de benzilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG) y 0.02 mg/l de ácido naftaleno acético (ANA), luego los tallos o cada uno de sus nudos se cortaron y transfirieron individualmente a medios conteniendo 0.01 mg/l de ANA, lográndose así hasta el cien por ciento de enraizamiento (Fig 3). Esta técnica ha sido aplicada con éxito a más de 200 variedades de yuca.

En el cultivo de meristemas se ha buscado con frecuencia la formación simultánea de tallos y raíces en el mismo medio de cultivo. Este enfoque es posible cuando se trabaja con un número pequeño de variedades, sin embargo, cuando se trata de colecciones grandes de germoplasma como es el caso del CIAT, el enfoque mencionado no es eficiente debido a la variabilidad genética de los diferentes materiales durante su cultivo in vitro. En contraste, un enfoque de cultivo en dos etapas, como en la papa y la yuca, permite contra-restar los efectos varietales y regenerar plantas consistentemente. Además, el tallito que se ha formado a partir del meristema puede ser utilizado para micro-propagar el clon por medio de segmentos nodales (Fig 3).

Desde la explantación del meristema hasta el trasplante de las plántulas a macetas y al campo, se pueden distinguir varias fases en el desarrollo de los meristemas, cada una de las cuales puede requerir condiciones específicas de luz, temperatura y humedad. En el caso de la yuca, por ejemplo, una iluminación de 2,000 lux es apropiada para el crecimiento inicial del tallo y de 5,000-6,000 lux para el enraizamiento, la temperatura durante estas etapas se mantiene a 28-30°C en el día y a 24-26°C en la noche, la humedad relativa en los tubos de ensayo es cercana al 100%. Antes de su transferencia a potes, los cultivos deben pasar por una fase de aclimatación, la cual imparte a las plántulas tolerancia al estrés de baja humedad. Esta aclimatación se consigue aumentando la iluminación a 8,000-10,000 lux, disminuyendo la temperatura a 24-25°C y quitando el papel parafinado de las tapas para reducir la humedad relativa en el tubo de ensayo.

5 Transplante a Potes y al Campo

Cuando las plántulas han sido reforzadas por la aclimatación se puede conseguir hasta el 100% de prendimiento en el trasplante a potes. Esta operación se realiza en el invernadero, usando potes tipo "Jiffy" o bolsas de plástico, como sustrato se puede usar una mezcla de suelo con arena en la proporción 1:2, la cual debe ser previamente esterilizada. Las raíces de las plántulas deben ser lavadas antes de su trasplante y el sustrato debe estar humedecido con agua blanda a la mitad de su capacidad de campo. El riego de las plantas con un fertilizante rico en fósforo (ej. NPK 10-52-10) estimula el establecimiento rápido (Fig. 2D).

Durante las dos primeras semanas, las plantas se deben mantener en un ambiente de alta humedad, luego se las expone gradualmente al ambiente externo antes del trasplante al campo. Las plantas de yuca se encuentran listas para el trasplante al campo cuando tienen de 10 a 15 cm de altura y han desarrollado 8 a 10 hojas expandidas. Esta operación se debe realizar de preferencia en un día nublado o en horas de la tarde, el suelo debe encontrarse preparado y húmedo. Después de 2-4 semanas las plantas se establecen completamente en el campo (Fig. 2E).

6 El Medio de Cultivo

El medio de cultivo debe proporcionar al meristema los nutrimentos y los factores de crecimiento necesarios para la diferenciación de tallos, hojas y raíces. El medio de cultivo está constituido por dos grupos de sustancias: el medio basal (Cuadro 1), formado por sustancias que proporcionan los nutrimentos inorgánicos mayores y menores, una fuente de carbono y

de energía (sucrosa), y vitaminas y los reguladores de crecimiento de tipo hormonal (auxinas, citoquininas, giberelinas, etc) los cuales estimulan, retardan o inhiben el crecimiento y desarrollo de los meristemas

Existen varias formulaciones del medio basal, siendo la de Murashige y Skoog (MS) de 1962, la que más ampliamente se utiliza como medio basal para el cultivo de meristemas de un rango amplio de especies, incluyendo la yuca, la papa, el taro, el camote, el cacao, etc. El Cuadro 1 presenta los constituyentes del medio basal MS, el cual ha sido ligeramente modificado para su utilización con la yuca. Los constituyentes han sido divididos en 7 soluciones madres para facilitar su preparación, en el Cuadro 1 se encuentran también las cantidades de cada ingrediente para preparar cada solución madre y los volúmenes que se deben tomar para preparar un litro de medio basal.

El medio basal es suplementado con los reguladores de crecimiento. La clase y concentración de cada regulador, así como la combinación de varios reguladores, determinan el crecimiento de los meristemas cultivados in vitro multiplicación celular sin organogénesis (formación de callo), formación de uno o varios tallos, formación de raíces, etc. En el caso de la yuca, por ejemplo, concentraciones bajas de BAP estimulan la formación de tallos, mientras que en concentraciones medias y altas los tallos se inician pero no crecen, dando lugar a la formación de cultivos en roseta (tallos muy pequeños con numerosos nudos), el crecimiento de los tallos ocurre al reducir la concentración de BAP y/o al agregar AG al medio de cultivo. Por otra parte, concentraciones medias y altas de BAP actúan sinérgicamente con el ANA para estimular el desarrollo de callo en la base del tallo. El BAP ejerce un efecto doble sobre los meristemas de yuca: mientras que la iniciación de tallos es estimulada, la formación de raíces es inhibida. Sin embargo, el azúcar contra-resta este efecto y favorece la formación de raíces cuando los niveles de BAP son bajos (0.01-0.02 mg/l), se requiere 2% de sucrosa para estimular el enraizamiento, pero si el nivel de BAP es alto (0.05-0.1 mg/l), el crecimiento de las raíces se consigue con 4-5% de sucrosa.

ERRADICACION DE PATOGENOS

Con algunas excepciones (ej. el virus latente de la papa de los Andes, el viroide del tubérculo ahusado de la papa, el virus del mosaico común del frijol, etc.) los virus no se transmiten a través de la semilla, por lo tanto las plántulas provenientes de semilla resultarán sanas, sin embargo, las semillas no son apropiadas para la conservación de cultivos de propagación vegetativa. En cultivos clonales, los virus se transmiten

de una generación a otra por medio del material de propagación con el resultado de que muchas variedades se encuentran completamente infectadas con uno o más virus

Desde que Limasset y Cornuet descubrieron, en 1949, que la concentración de virus disminuye conforme se acercaban al meristema apical, se postuló la posibilidad de producir clones libres de virus a partir de plantas infectadas. Fue Morel y Martín, en 1952, quienes confirmaron dicha hipótesis al producir plantas de dalia y de papa libres de virus mediante el cultivo de meristemas

Los virus, a diferencia de las bacterias y los hongos, no pueden ser eliminados por medio de la aplicación de químicos a las plantas infectadas. Existe una íntima relación entre la multiplicación de los virus y el metabolismo celular. Por este motivo se espera que cualquier factor que afecte al metabolismo celular también pueda afectar a la multiplicación de virus en la planta

La erradicación de virus depende, no sólo del tipo de virus y su interacción con la variedad, sino también del tamaño del meristema que se cultiva. Cuanto más pequeño es el tejido, la probabilidad de erradicación es mayor, sin embargo, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo, meristemas muy pequeños (0.1-0.3 mm) crecen muy lentamente o no crecen del todo

Tratamientos químicos o físicos de las plantas o tejidos infectados pueden interferir con la multiplicación y el movimiento del virus en la planta. Estos tratamientos permiten aislar meristemas de mayor tamaño (0.4-0.5 mm), lo cual favorece su crecimiento in vitro, manteniendo alta, y con frecuencia aumentando, la tasa de erradicación de virus

1 Quimioterapia

Ciertas sustancias (ej. análogos de purinas y pirimidinas, inhibidores metabólicos, reguladores de crecimiento, etc.) aplicadas a las plantas o tejidos infectados afectan la multiplicación de virus. Sin embargo, la mayoría de estas sustancias resultan también fitotóxicas. Por este motivo, su utilización práctica está limitada

2 Termoterapia

El tratamiento de plantas o tejidos con temperaturas altas (35-40°C) disminuye la multiplicación y translocación de virus en los tejidos. En algunos casos (ej. virus del enrollamiento de la hoja de la papa, virosis de la caña de azúcar, etc.) dicho tratamiento ha "curado" las plantas de virosis. Sin embargo, es generalmente aceptado que la termoterapia no erradica al

virus sino que previene la invasión del meristema por el virus. Un tratamiento de termoterapia (35-37°C por 3 semanas) a plantas de papa infectadas con el virus X redujo significativamente la infectividad relativa del virus y contribuyó a aumentar la tasa de erradicación del virus X por cultivo de meristemas (Cuadro 2) Igualmente, la limpieza de una enfermedad de la yuca llamada "cuero de sapo" (probablemente causada por un virus) fué más efectiva cuando se cultivaron meristemas pequeños que fueron obtenidos de retoños de estacas tratadas con calor (40°C en el día y 35°C en la noche, durante 3 semanas)(Cuadro 3)

La utilización de la técnica de cultivo de meristemas para la erradicación de enfermedades causadas por virus debe ser apropiadamente integrada con la aplicación de técnicas de virología, de tal manera que el esquema general de erradicación comprenda los siguientes pasos

- a Identificación del agente causal,
- b Aplicación de la técnica de erradicación (termoterapia seguida por el cultivo de meristemas),
- c Aplicación de pruebas de detección de virus (transmisión mecánica, transmisión por áfidos, por injertos, serología, microscopía electrónica, electroforesis, etc)
- d Propagación del material libre de virus *

Los métodos de limpieza clonal por cultivo de meristemas también son efectivos para la erradicación de bacterias y hongos sistémicos

CONSERVACION DE RECURSOS GENETICOS

El germoplasma puede ser conservado como semilla, polen, en forma de órganos vegetativos y como plantaciones en el campo. Es esencial que el método de conservación garantice viabilidad y estabilidad genética máximas, pero también se debe considerar los costos de conservación. Además sería una gran ventaja que los materiales se encuentren libres de plagas y patógenos y fácilmente accesibles para su multiplicación y distribución internacional.

Las semillas cumplen con la mayoría de estos requisitos, puesto que pueden ser mantenidas por períodos largos bajo

* El término "libre de virus" se debe usar siempre y cuando se especifique los virus que han sido eliminados y las pruebas de detección utilizadas

condiciones de humedad y temperaturas bajas Sin embargo, la conservación de muchos cultivos de importancia económica por medio de la semilla no es apropiada debido a problemas de infertilidad, a que la viabilidad de la semilla es muy corta, la segregación genética es muy alta y a la deterioración rápida por patógenos que se transmiten por la semilla, Estos cultivos generalmente se conservan mediante la propagación vegetativa La longevidad de los órganos vegetativos es bastante corta, lo que hace necesario regenerar las plantas en cortos intervalos Ya se han discutido los problemas que resultan de la conservación de estos materiales mediante cultivos sucesivos en el campo, también se han mencionado las ventajas del cultivo de meristemas como un medio para la conservación de especies de propagación vegetativa

Todo sistema de conservación por cultivo de tejidos debe cumplir con dos requisitos que los métodos de regeneración de plantas deben ser aplicados para un rango amplio de variedades y que la estabilidad genética de los materiales sea alta En varios ejemplos, como en la papa y la yuca, se han diseñado metodologías de cultivo y regeneración de plantas aplicables a muchas variedades Los cultivos de células de origen somático, no-meristemático, y de origen germinal con frecuencia presentan inestabilidad citogenética, ej la ocurrencia de euploidía y aneuploidía, así como otras aberraciones cromosómicas, son frecuentes en algunas especies, al grado que ha sido posible seleccionar líneas con variaciones físicas y químicas específicas

Por otro lado, se ha demostrado que los cultivos de meristemas son altamente estables debido a que la multiplicación celular no ocurre en forma desordenada, pero obedece a la alta organización citohistológica del meristema

Las posibilidades de variación genética de los cultivos de tejidos pueden ser minimizadas manteniendo las células a temperatura ultrabaja (ej en nitrógeno líquido), la cual inmoviliza las actividades metabólicas Los cambios genéticos también se minimizan cuando los materiales se mantienen en forma de estructuras organizadas (ej yemas o plántulas derivadas de cultivos de meristemas)

1 Conservación en Nitrógeno Líquido

En años recientes se ha demostrado que los cultivos de tejidos que han sido tratados apropiadamente pueden ser conservados en nitrógeno líquido El tratamiento generalmente consiste en la aplicación de un agente protector (ej dimetil sulfóxido, glicerol, sucrosa, etc) al medio de cultivo, en el control de la velocidad de enfriamiento (ej rápida 500-1000°C por minuto, lento 1-10°C por minuto) y recalentamiento rápido (ej 1000°C por minuto) La tarea consiste entonces en encontrar la

combinación apropiada de estos factores para que los daños causados por la baja temperatura (ej destrucción de las membranas por el crecimiento de cristales de hielo, por la deshidratación del protoplasto y el aumento de la concentración de sales como consecuencia de la pérdida del agua celular, etc) se reduzcan al mínimo

La capacidad de regenerar plantas a partir de los cultivos conservados en nitrógeno líquido es un imperativo práctico. Por ejemplo, de once especies conservadas en nitrógeno líquido en forma de células y callos sólo en dos de ellas ha sido posible recuperar plantas. Sin embargo, cuando se utilizan meristemas, yemas o plántulas para la conservación de cinco especies, todas fueron capaces de regenerar plantas en forma variable (10% en papa, 5% en clavel, 60% en arverjas y 90% en manzano). Es entonces claro que en un programa de conservación en nitrógeno líquido preferiblemente deben usarse meristemas o yemas.

Se realizan mayores estudios en este campo los cuales, en un futuro, deberán permitir su utilización en forma consistente y confiable.

2 Conservación en Condiciones de Crecimiento Mínimo

Como alternativa al uso del nitrógeno líquido, una forma de conservación práctica y altamente confiable consiste en mantener yemas o plántulas derivadas de cultivos de meristemas en condiciones de crecimiento mínimo de tal forma que el intervalo de transferencia a medios frescos se extienda al máximo posible. Este sistema debe asegurar una alta viabilidad de los materiales así como facilitar la recuperación de plantas con alta estabilidad genética.

La tasa de crecimiento de los cultivos puede ser controlada por varios factores, tales como la temperatura de incubación, la concentración osmótica del medio de cultivo, el uso de reguladores de crecimiento (retardatorios e inhibitorios), etc. Es necesario investigar con diferentes clases, niveles y combinaciones de estos factores para obtener un sistema capaz de permitir un crecimiento mínimo y, al mismo tiempo, una alta viabilidad de los materiales.

Cuando se conservó la papa en la forma de cultivos de nudos derivados de meristemas a 24°C, el crecimiento de los cultivos fué tan rápido que a los 6 meses entraron en senescencia, sin embargo, los cultivos conservados a 6°C crecieron lentamente y mantuvieron alta viabilidad (Figs 4Aa y b). La adición de 20 mg/l de ácido abscísico al medio de cultivo, a 24°C, resultó detrimental para los cultivos (Fig 4Ac). Se logró una mayor viabilidad al conservar los cultivos a 6°C en un medio que contenía 6% de sucrosa, y a 24°C en un medio que contenía 6% de

sucrosa y 5-10 mg/l de ácido abscísico (Figs 4Ba y b) La alta viabilidad de los cultivos a 6°C se debió a la proliferación de estolones y a la formación de tubérculos. Los porcentajes de viabilidad después de 10 meses de conservación de cultivos de papa se presentan en el Cuadro 4. La viabilidad más alta ocurre a 6°C con 6% de sucrosa y a 24°C con 5-10 mg/l de ácido abscísico. Bajo estas condiciones, el período de transferencia de los cultivos puede ser extendida hasta un año.

La viabilidad de los cultivos de yuca conservados por 18 meses es mucho mayor a 20-22°C que a 28-30°C (Fig 4C). En la yuca, como ocurre también en la papa, no sólo el factor temperatura pero también la composición del medio de cultivo influyen en el crecimiento y la viabilidad de los cultivos. El Cuadro 5 muestra que cuando el BAP del medio es de 0.01 a 0.02 mg/l, el crecimiento de los cultivos aumenta con la adición de sucrosa hasta el 2%, a niveles mayores de sucrosa no ocurren cambios significativos en el crecimiento, sin embargo, cuando el BAP del medio es de 0.05 a 1.0 mg/l, la adición de sucrosa del 3% hasta el 6% reduce el crecimiento de los cultivos. Sin embargo, también ocurren pérdidas de la viabilidad de los cultivos, siendo la pérdida mayor a 30/25°C que a 22/22°C.

Una combinación apropiada de estos factores para la conservación de la yuca en la forma de cultivos de meristemas consiste en el control de una temperatura de 20-22°C, una iluminación de 1,000 lux, el fotoperíodo de 12 horas y el medio de cultivo basal de MS con sucrosa al 1 ó 4%, 0.01 ó 0.05 mg/l BAP y 0.1 mg/l de AG. Bajo estas condiciones, el período de transferencia mínimo de los cultivos de yuca se extiende a los 2 años. En un cuarto de conservación con superficie total de estanterías de 40 m² se pueden mantener de 10-12 mil tubos. Al final del período de dos años, se procederá a obtener las yemas axilares de los cultivos y explantarlas en medios frescos para re-iniciar un nuevo período de conservación, en esta forma el sistema adquiere la característica de conservación a largo plazo.

Se han realizado pruebas periódicas de recuperación de plantas, las que han sido llevadas hasta el campo, y se ha demostrado la estabilidad de las características varietales tanto en la papa como en la yuca.

INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA

La producción de variedades con alto rendimiento y con resistencia a plagas y enfermedades requiere que los recursos genéticos de la especie se encuentren accesibles para su utilización en diferentes regiones o países. Sin embargo, este proceso de transferencia se encuentra restringido debido a los

riesgos de diseminar plagas y enfermedades con los materiales de propagación, especialmente cuando se mueven de su centro de origen a otras regiones. La detección de materiales enfermos es aún más difícil cuando la enfermedad es causada por virus, algunos de los cuales pueden presentarse en forma latente.

La introducción de un organismo a un ecosistema no siempre resulta en su establecimiento, sin embargo, se debe admitir que al aumentar la frecuencia de introducciones, sin un control adecuado, las propabilidades de que una plaga o un patógeno se establezcan son mayores. Por este motivo, los programas de cuarentena han sido creados para proteger los cultivos de una región o país contra plagas y enfermedades extrañas. Esta protección es particularmente importante cuando la economía de un país está basada en la agricultura, como ocurre en los países tropicales.

El establecimiento de un programa de cuarentena eficiente, el cual debe permitir el flujo controlado de germoplasma valioso, es un proceso complejo y costoso. Mientras se establecen o se mejoran dichos programas, es imprescindible que se tomen medidas para minimizar las posibilidades de diseminación de plagas y patógenos.

Debido a su limpieza de micro-organismos, los cultivos de meristemas pueden ser utilizados para el intercambio de germoplasma, reduciendo significativamente las posibilidades de diseminación de plagas y patógenos, especialmente cuando se intercambian materiales de propagación vegetativa.

Los cultivos de meristemas, o los cultivos de yemas o plántulas derivadas a partir de meristemas, establecidos en un medio nutritivo artificial, deben encontrarse libres de insectos, nemátodos, ácaros, de hongos y bacterias. Si estos organismos se encuentran presentes, contaminarían rápidamente el medio de cultivo y podrían ser detectados. En el caso de virus, los cultivos para intercambio deben iniciarse a partir de plantas que se han liberado de virus. Además, los cultivos de meristemas cumplen con el principio básico de cuarentena, de que cuanto más pequeño es el material que se envía, menores son los riesgos.

En un programa de intercambio de materiales por medio del cultivo de meristemas, se pueden distinguir las siguientes etapas:

1 Selección de los Materiales

La clase de materiales que se asignan para su distribución depende de las necesidades y del estado de desarrollo de los programas de investigación de la región o país receptor. Se pueden enviar variedades, híbridos promisorios y germoplasma.

básico

2 Preparación de los Cultivos

Consiste en el establecimiento de los cultivos de meristemas a partir de yemas obtenidas de los materiales seleccionados. En el caso de encontrarse algún material infectado con virus, se procederá a la eliminación del virus por termoterapia y cultivo de meristemas.

Los cultivos pueden enviarse en forma de meristemas, de yemas y de plántulas enraizadas. La forma más apropiada, desde el punto de vista de su manejo en el país receptor, es el de plántula derivada de cultivos de meristemas (Fig 4D).

En la yuca, estas plántulas se inician fácilmente a partir de nudos cortados de los tallos formados a partir de meristemas (Fig 3). Los nudos se cultivan en el medio de enraizamiento ya descrito y se mantienen con iluminación alta (5,000-6,000 lux) para producir un tallo corto con varios nudos y hojas verdes (Fig 4D).

Debido a su capacidad de detectar cualquier contaminante del aire o sistémico, los cultivos deben ser críticamente observados durante su crecimiento, antes del envío.

3 Empaque y Envío

Los tubos con los cultivos pueden ser empacados en cajas de poliestireno (Fig 4E). En envío debe hacerse preferentemente por vía aérea, es importante coordinar la llegada de los cultivos a su destino para reducir la duración del viaje. A pesar que la yuca es muy sensible a la oscuridad prolongada, viajes de hasta 15 días no afectaron significativamente a los materiales. Variaciones en la temperatura de 0° a 45°C durante envíos de yuca por correo aéreo no afectaron a los cultivos.

4 Manejo en el País Receptor

Este aspecto es de particular importancia en el éxito del intercambio de cultivos de meristemas. Es necesario que la institución receptora cuente con facilidades mínimas y con el personal entrenado para recuperar y micro-propagar, si fuera posible, los cultivos antes de su trasplante a potes.

Cuando se envían plántulas enraizadas lo mínimo que se requiere, en el país receptor, es exponer los cultivos a una iluminación de 500-600 lux y una temperatura de 25°- 26°C durante 1-2 semanas para recuperarlos de los efectos negativos de la falta de luz. Cultivos de yuca enviados del CIAT a Asia del Sur llegaron al país receptor, después de un mes de viaje, en estado de etiolación intensa y con daños causados por la

oxidación de los fenoles exudados por las raíces, sin embargo, después de exponer dichos cultivos a las condiciones arriba descritas, fué posible recuperar nudos y micro-propagarlos para producir plantas (Fig 3)

Después de su recuperación de los tubos, las plantas deben ser transplantadas a potes para su seguimiento fitosanitario bajo condiciones de invernadero (Fig 4F)

5 Propagación y Re-distribución

Después del seguimiento fitosanitario, los materiales pueden ser propagados por medio de técnicas de cultivos de meristemas y/o técnicas más convencionales (ej esquejes, hojas, estacas, bulbos, etc) Un sistema de propagación que utilice una combinación de ambas técnicas sería el más conveniente

El entrenamiento de personal técnico de los países involucrados en el intercambio de germoplasma como cultivo de meristemas es un aspecto de mayor importancia en todo el proceso

PROPAGACION RAPIDA

Un requisito en la conservación de recursos genéticos por cultivo de meristemas es que los materiales que se recuperan del medio de conservación puedan ser rápidamente multiplicados antes de su distribución internacional o antes de su utilización en pruebas de campo Igualmente, en el proceso de intercambio de germoplasma, es necesario que los materiales puedan ser rápidamente propagados a partir de la importación de pocos cultivos La multiplicación debe realizarse en lo posible en condiciones de limpieza de plagas y enfermedades

La vía más simple para la propagación de plantas por medio del cultivo de meristemas es la organogénesis directa (Fig 5), la cual consiste en estimular la proliferación de yemas axilares durante el cultivo de los meristemas Otra vía de propagación consiste en la inducción de yemas adventicias (Fig 5) a partir del meristema

La propagación por proliferación de yemas axilares ocurre en la yuca Por efecto de concentraciones altas (0.2 a 0.5 mg/l) de BAP, se forma un cultivo en roseta, el cual comprende un tallo corto con numerosos nudos (Fase I, de iniciación), cada nudo del cultivo en roseta lleva una yema axilar incipiente, las cuales son estimuladas a crecer para formar numerosos tallos (Fig 6A) en un medio con baja concentración (0.05 mg/l) de BAP y con 0.1 mg/l de AG (Fase II, de proliferación) Cada uno de los tallos puede ser segmentado (Fig 6B) en porciones conteniendo

una yema axilar y cada segmento transferido al medio de enraizamiento (Fig 6C) para la formación de plantas (Fase III, de regeneración) Se pueden "cosechar" varias generaciones de tallos siempre y cuando el tejido proliferativo sea sub-cultivado Una vez establecido, es posible producir con este sistema de 10 a 20 plantas de yuca por mes por cada cultivo inicial, y 30-40 plantas por mes por el primer sub-cultivo, etc

En la papa se desarrolló un método de multiplicación por formación de yemas adventicias y axilares (Fig 6D) a partir de ápices cultivados en concentraciones altas (2-3 mg/l) de BAP (Fase I, de iniciación), las yemas así iniciadas sólo crecieron cuando se redujo la concentración de BAP y se agregó al medio 0.1 mg/l de AG, formándose cultivos de tallos múltiples (Fig 6E) (Fase II, de proliferación) Al igual que en la yuca, cada uno de los tallos se dividió en segmentos de un solo nudo (Fig 6F), a partir de los cuales se desarrollaron plántulas completas (Fig 6G) (Fase III, de regeneración) El potencial de propagación de este sistema es de 70 plantas por mes por cada cultivo inicial y 200 plantas por mes por el primer sub-cultivo, etc

Las técnicas de micro-propagación descritas deben, en lo posible, ser integradas con los métodos de propagación convencionales Esta integración consistiría en utilizar los materiales provenientes de la micro-propagación por meristemas como material básico limpio para su propagación por métodos convencionales, usando esquejes, yemas, estacas, bulbos, tubérculos, hijuelos, etc En el caso de la papa, las plantas provenientes de la micro-propagación se han usado como plantas madres para la multiplicación por esquejes y tubérculos en el invernadero Estos propágulos fueron a su vez usados para la producción de material de siembra en el campo Igualmente, en la yuca, las plantas madres provenientes de la micro-propagación pueden ser usadas para la multiplicación rápida por medio de brotes crecidos de estacas Una nueva técnica de multiplicación rápida de la yuca, desarrollada por investigadores filipinos y que utiliza esquejes de una sola hoja, tiene el potencial de producir 300,000 plantas al año a partir de una planta madre

No está demás enfatizar en la necesidad de desarrollar métodos innovativos para la conservación a largo plazo de materiales vegetativos La aplicación de la criogénesis para la conservación de plantas en la forma de cultivos de tejidos ofrece grandes posibilidades para el futuro Sin embargo, se ha demostrado que, a corto plazo, el cultivo de meristemas puede ser utilizado como un medio de conservación y de intercambio

internacional de germoplasma con numerosas ventajas sobre los métodos convencionales

En el caso de la yuca, el cultivo de meristemas ha sido integrado dentro de un programa multi-disciplinario para el mejoramiento del cultivo. La técnica está siendo utilizada para la limpieza clonal de materiales infectados, para la conservación y la transferencia internacional de germoplasma (Fig 7)

Posiblemente, la mayor dificultad que se encuentra en la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos reside en la falta de personal adecuadamente entrenado para realizar estos trabajos. Los programas de entrenamiento de las instituciones nacionales e internacionales pueden cumplir un rol importante en esta área. Así por ejemplo, la creación de una red de centros regionales encargados del intercambio de recursos genéticos en forma diversa, incluyendo los cultivos de meristemas, facilitaría el movimiento de estos materiales a la vez que aliviaría los mayores problemas fitosanitarios. Se realizan esfuerzos en estas áreas para cultivos de importancia económica tales como la yuca, la papa, la caña de azúcar, etc

BIBLIOGRAFIA

- Bajaj, Y P S and Reinert, J 1977 Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene banks, pp 757-777, In Plant Cell, Tissue and Organ Culture, J Reinert and Y P S Bajaj (eds), Springer Verlag, New York
- Berg, L A and M Bustamante 1974 Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas Phytopath 64 320-322
- Centro Internacional de Agricultura Tropical 1980 Cassava Tissue Culture Section, In Annual Report, CIAT, 1979 Cali, Colombia
- Centro Internacional de Agricultura Tropical 1980 El Cultivo de Meristemas en Yuca Guía de Estudios para la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema CIAT, Cali, Colombia
- Centro Internacional de la Papa 1978 Thrust IX, Seed Production for Developing Countries, In Annual Report, CIP, 1977 Lima, Perú
- Grout, W W and G G Henshaw 1978 Freeze preservation of potato shoot-tip cultures Am Bot 42 1227-1229

- Hartman, R D 1974 Dasheen mosaic virus and other phytopathogens eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips *Phytopath* 64 237-240
- Henshaw, G G and W M Roca 1976 Special techniques in germplasm storage, *In* Planning Conference on Exploration and Maintenance of Germplasm Resources, CIP, Lima, Perú
- Hewitt, W B and L Chiarappa (eds) 1977 Plant Health and Quarantine in the International Transfer of Genetic Resources CRC Press, Cleveland, Ohio
- Kartha, K K and O L Gamborg 1978 Meristem culture techniques in the production of disease-free plants and freeze-preservation of germplasm of tropical tuber crops and grain legumes, pp 267-283, *In* Diseases of Tropical Food Crops, H Marathe and J A Meyer (eds), Proceedings of an International Symposium held at U C L Lovain-la-Neuve, Belgium
- Litz, R E and R A Conover 1978 *In vitro* propagation of sweet potato *Hort Science* 13 659-660
- Martin, F W 1975 The storage of germplasm of tropical roots and tubers in the vegetative form, pp 369-377, *In* Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow, O H Frankel and J G Hawkes (eds), Cambridge University Press, Cambridge
- Murashige, T 1974 Plant propagation through tissue cultures *Ann Rev Plant Physiol* 25 135-166
- Murashige, T and F Skoog 1962 A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures *Physiol Plantarum* 15 473-496
- Nestel, B and R MacIntyre (eds) 1975 The International Exchange and Testing of Cassava Germplasm Proceedings of a workshop held at CIAT, Cali, Colombia
- Quak, E 1977 Meristem culture and virus-free plants, pp 598-615, *In* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, J Reinert and Y P S Bajaj (eds) Springer-Verlag, New York
- Roca, W M , N O Espinoza, M R Roca and J E Bryan 1978 A Tissue culture method for the rapid propagation of potatoes *Am Potato J* 55 691-701
- Roca, W M , J E Bryan and M R Roca 1979 Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources *Am Potato J* 56 1-10

- Roca, W M 1979 Tissue culture methods for the international exchange and conservation of cassava germplasm Cassava Newsletter, No 6, Series OIEC-6 3-5
- Roca, W M , A Rodríguez, L Pateña, R Barba and J C Toro 1980 Improvement of a propagation technique for cassava using single leaf-bud cuttings A preliminary report Cassava Newsletter, No 8, Series OIEC-8 4-5
- Sakai, A and Y Nishiyama 1978 Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen Hort Science 13 335-337
- Seibert, M 1976 Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C Science 191 1178-1179
- Waterworth, P and R P Kahn 1978 Thermotherapy and aseptic bud culture of sugarcane to facilitate the exchange of germplasm and passage through quarantine Plant Dis Reporter 62 772-776
- Westcott, R J , G G Henshaw, B W W Grout, and W M Roca 1977 Tissue culture methods and germplasm storage in potato Acta Hort 78 45-49

AGRADECIMIENTOS

Gran parte de este trabajo está basado en los resultados de las investigaciones realizadas en la Sección de Fisiología, Unidad de Recursos Genéticos del CIAT, por lo que el autor desea reconocer con gratitud la ayuda de los siguientes colaboradores de investigación Ing J Rodríguez, Biol J Roa, Biol J Beltrán, A Rodríguez y de los asistentes P Florez y W Echeverry. Igualmente se agradece a la Srta H Dierolf por su eficiente ayuda secretarial.

FIGURA 1 Cultivo de Meristemas de la Yuca aislamiento del meristema, cultivo aséptico en medios nutritivos y crecimiento de plantas

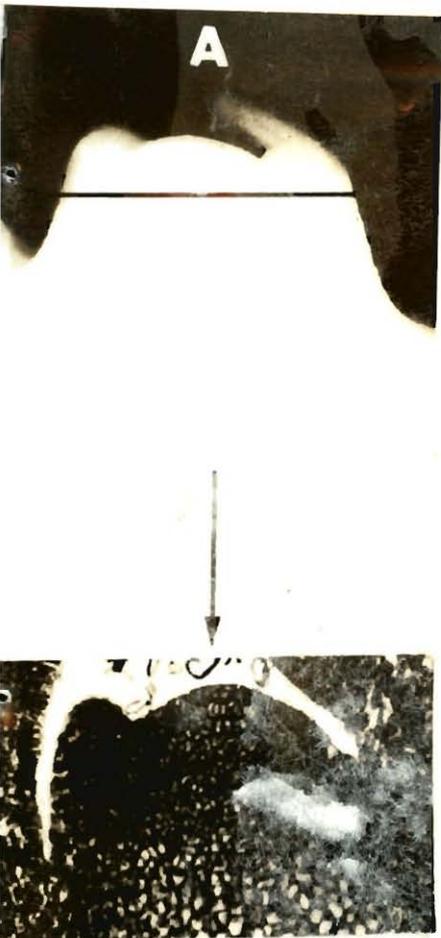


FIGURA 3. Técnica de dos etapas para el cultivo de meristemas de la yuca: I. Iniciación de tallos; II. Enraizamiento y micro-propagación por cultivo de nudos.

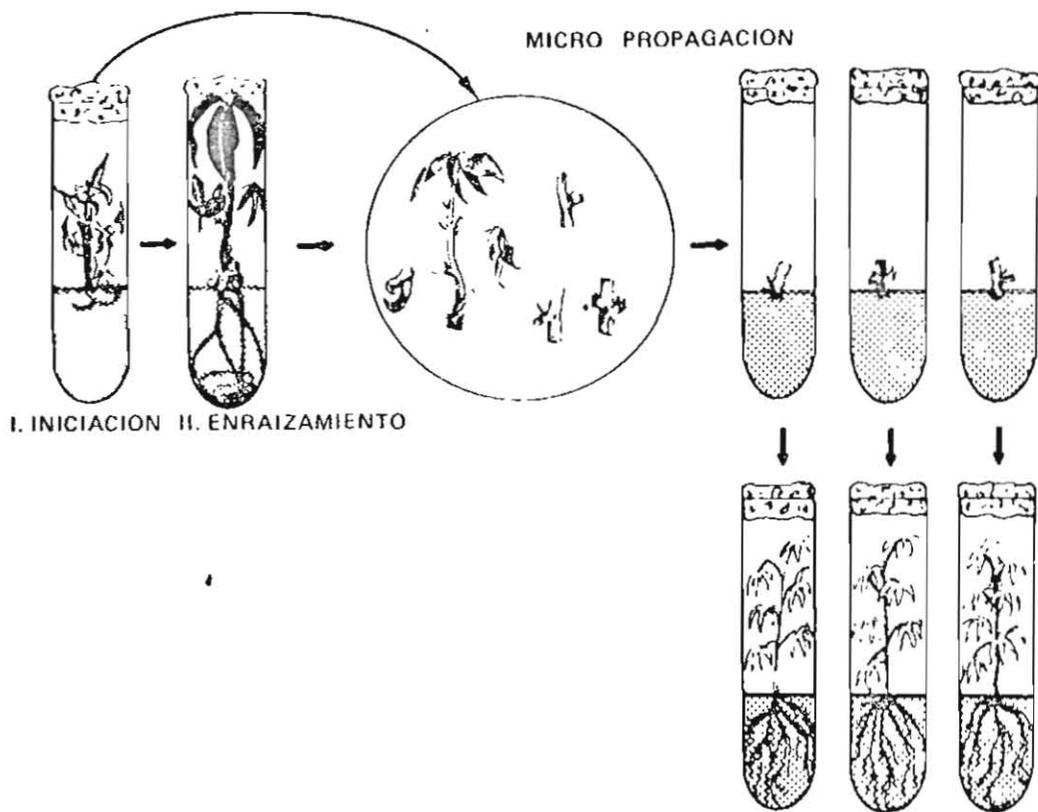


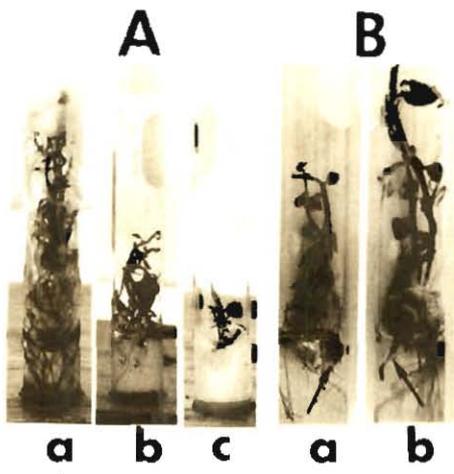
FIGURA 4. Conservación e Intercambio de Recursos Genéticos por Cultivo de Meristemas.

- Aa y Ab: Conservación de la papa a 24°C y 6°C, respectivamente.
- Ac : Conservación de la papa a 24°C, con 20 mg/l de ácido abscísico.
- Ba y Bb: Conservación de la papa a 6°C, con 6% de sucrosa y a 24°C con 6% de sucrosa más 10 mg/l de ácido abscísico, respectivamente.
- Ca y Cb: Conservación de la yuca a 20-22°C y a 28-30°C, respectivamente.

Los cultivos de papa se muestran a los 6 meses y los de yuca a los 18 meses de conservación.

- D y E : Preparación y empaque de cultivos de yuca para la transferencia internacional.
- F : Seguimiento fitosanitario de plantas de yuca recuperadas de cultivos de meristemas después de su transferencia al CIAT.

(Las figuras A y B corresponden a trabajos realizados por el autor en el CIP, Lima, Perú, 1978.)



Dr. W. M. Roca

CIAT APARTADO AEREO 6711
 CAJES - CINATROP
 CALI - COLOMBIA
 CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL

TO:

Dr. D. E. Giacometti
 CENARGEN
 P.O. BOX 10, 2172

85-
 EMBRA



FIGURA 5.

PROPAGACION DE PLANTAS POR CULTIVO DE MERISTEMAS

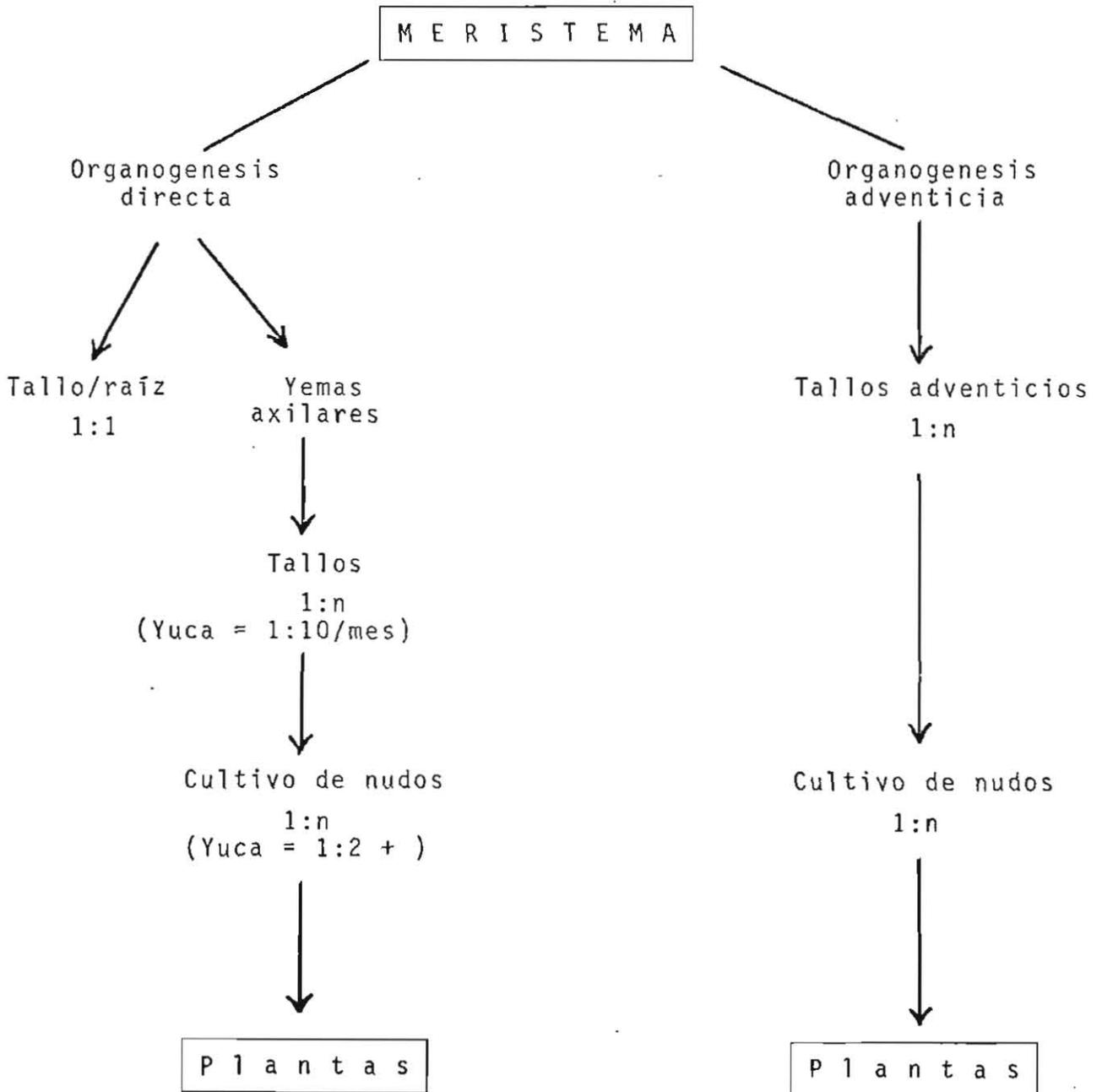


FIGURA 6. Propagación Rápida por Cultivo de Meristemas.

A, B y C: Secuencia de la producción de plantas de yuca a partir de cultivos de tallos múltiples.

D, E, F y G : Secuencia de la producción de plantas de papa a partir de cultivos de tallos múltiples.

(Las figuras D-G corresponden a trabajos realizados por el autor en el CIP, Lima-Perú, 1978)

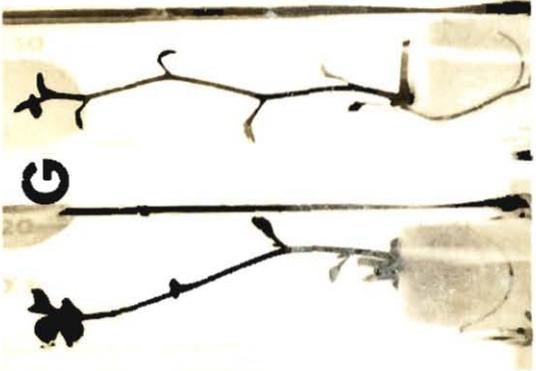
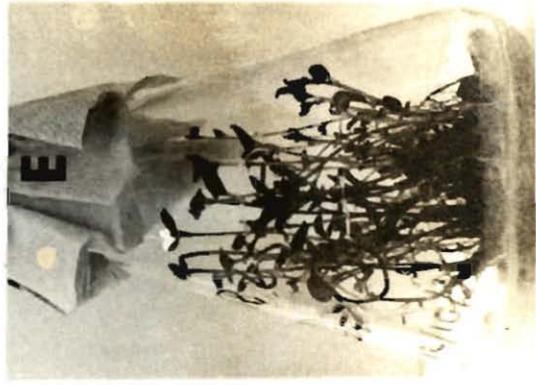
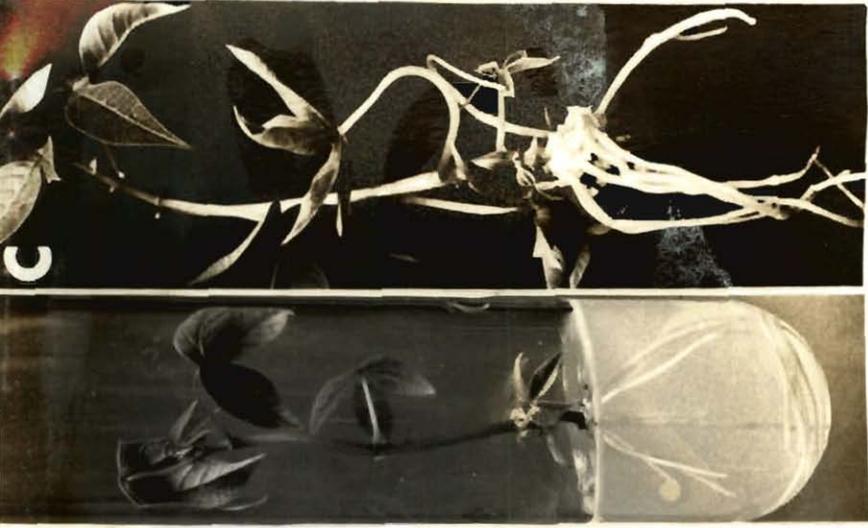
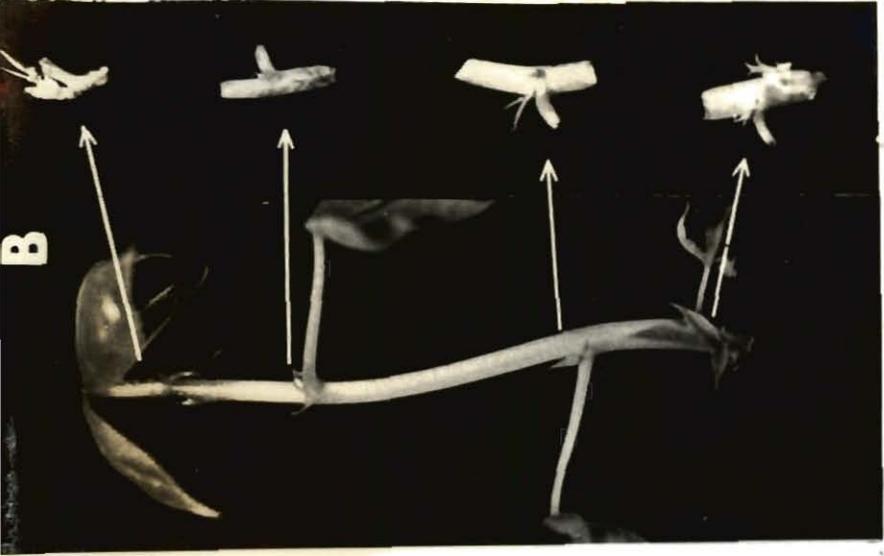
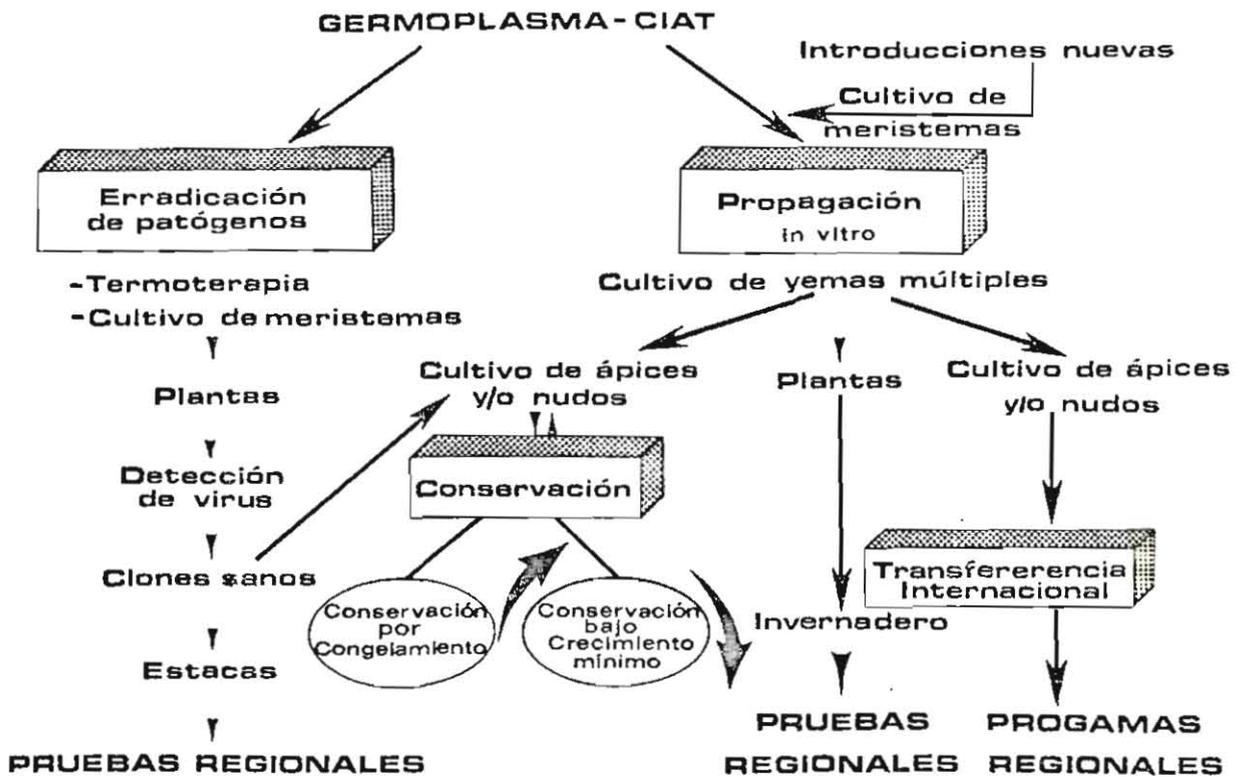


FIGURA 7. Resumen de la utilización del cultivo de meristemas en la yuca.



CUADRO 1.

MEDIO BASAL PARA EL CULTIVO DE MERISTEMAS

Constituyentes	Cant./Const./ Sol. Madre*	Concentración Final**		Volumen/Sol. madre/litro Medio Basal
		Masa	Moles	
NH_4NO_3	82,500 mg	1650 mg	20.6mM	
KNO_3	95,000 mg	1900 mg	18.8mM	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18,500 mg	370 mg	1.5mM	
KH_2PO_4	8,500 mg	170 mg	1.25mg	20 ml
H_3BO_3	620 mg	6.2 mg	100 μM	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,176 mg	22.3 mg	100 μM	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860 mg	8.6 mg	29.9 μM	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg	0.25 mg	1.03 μM	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg	0.025 mg	0.10 μM	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg	0.025 mg	0.105 μM	1.0 ml
KI	75 mg	0.83 mg	5 μM	1.0 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15,000 mg	440 mg	2.99mM	2.9 ml
Na_2EDTA	1,492 mg	37.3 mg	100 μM	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,114 mg	27.8 mg	100 μM	5.0 ml
Tiamina·HCl	20 mg	0.4-1.0 mg	1.18-2.96 μM	4-10 ml
m-Inositol	1,600 mg	100 mg	555 μM	12.5 ml

Medio de Murashige y Skoog (1962).

Disolver todos los constituyentes de la solución madre No. 1 en 1,000 ml de agua; todos los de la solución madre No. 2 en 100 ml; el No. 3 en 100 ml; el No. 4 en 100 ml; los Nos. 5, 6, 7 en 200 ml cada una.

Concentración final de cada constituyente en un litro de medio basal.

Usar 4 ml ó 10 ml de la solución madre/litro de medio basal cuando se trata de cultivo de meristemas o de ápices, respectivamente.

CUADRO 2.

EFFECTO DE LA TERMOTERAPIA EN LA INFECTIVIDAD Y EN LA ERRADICACION
DE VIRUS POR CULTIVO DE MERISTEMAS

Infectividad relativa* de virus X de la papa en hojas de *G. globosa*

Diluciones de extracto de hojas	Clone 800244		Clone 720057	
	Termoterapia	Control	Termoterapia	Control
1/10	+	+++	+	+++
1/100	-	++	+	+++
1/1000	-	++	-	++
1/10000	-	+	-	+
<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
% erradicación	90	5	40	2

* Número de lesiones locales por 1/2 hoja de *G. globosa*.
(Trabajo realizado por el autor en el CIP, Lima-Perú, 1977)

CUADRO 3.

LIMPIEZA DE "CUERO DE SAPO" POR CULTIVO DE MERISTEMAS DE LA YUCA

<u>Variedad</u>	<u>Tratamiento de estacas</u>	<u>Tamaño del meristema</u>	<u>% Plantas libre de Síntomas*</u>	
			<u>1er Ciclo</u>	<u>2º 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 2º 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.

CUADRO 4.

EFFECTOS DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO Y DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN LA VIABILIDAD DE NUDOS MERISTEMATICOS DE PAPA*

<u>Sucrosa</u> %	<u>ABA¹</u> mg/l	<u>% Viabilidad²</u>	
		<u>5 - 6°C</u>	<u>22 - 24°C</u>
3	0	75	15
	5	85	50
	10	90	38
	20	80	35
6	0	94 ³	10
	5	100 ³	42
	10	40	25
	20	42	5

1. Acido Ábscísico.

2. % cultivos que regeneran plantas después de 10 meses de conservación. \bar{x} de 15 variedades.

3. 70% de cultivos tuberizando

* Resumen de una parte de la investigación realizada por el autor en el CIP, Lima-Perú, 1978.

CUADRO 5.

EFFECTOS DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION Y DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO
EN EL CRECIMIENTO Y LA VIABILIDAD DE APICES DE YUCA CONSERVADOS IN VITRO

Medio de Cultivo	% de Sucrosa	Temperatura 30°C/25°C		Temperatura 22°C/22°C	
		cm/mes*	% Viabilidad**	cm/mes*	% Viabilidad**
1. Basal + 0.1 mg/l GA + 0.01-0.02 mg/l BAP	0.5	2.5	12	0.1	20
	1.0	3.8	28	0.3	25
	2.0	5.4	30	0.5	42
	3.0	3.5	28	0.4	75
	5.0	4.0	45	0.3	94
	6.0	4.2	15	0.2	22
2. Basal + 0.1 mg/l GA + 0.05-0.1 mg/l BAP	0.5	2.0	14	0.08	35
	1.0	2.5	48	0.2	96
	2.0	2.6	26	0.3	38
	3.0	3.0	29	0.4	65
	5.0	1.0	30	0.1	25
	6.0	0.8	10	0.05	15

* Promedio de 3 variedades, 5 cultivos/variedad

** Porcentaje de cultivos que pueden regenerar plantas después de un año de conservación