

OBTENCION DE PLANTAS DE TIQUISQUE BLANCO
(*Xanthosoma sagittifolium*), DE TIQUISQUE MORADO (*Xanthosoma violaceum*) Y
DE ÑAMPI (*Colocasia esculenta*) LIBRE DE VIRUS POR MEDIO DEL CULTIVO
***in vitro* DE APICES^{1/*}**

Mynor Monge**

Oscar Arias**

Pilar Ramírez***

ABSTRACT

Production of virus free plants of white cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) purple cocoyam (*Xanthosoma violaceum*) and taro (*Colocasia esculenta*) by shoot tips culture. White and purple cocoyam and Taro shoot tips were inoculated in test tubes containing modified MS medium, solidified with 0.8% of agar and supplemented with five levels of IAA (0, 10, 15, 20 and 25 mg/L and five of kinetin (0, 0.1, 0.5 1 and 2 mg/L) for a total of 25 treatments. Tissues evaluation showed that hormone combination of 25 mg/L IAA and 2 mg/L kinetin in white cocoyam and 10 mg/L of IAA alone in purple cocoyam, and 25 mg/L of IAA in Taro, were the best treatments to regenerate plants by direct organogenesis. In order to know the phytosanitary condition of the material, this was tested by the method of staining the citoplasmatic virus inclusions and the results showed that 90% of the plants were dasheen mosaic virus free.

INTRODUCCION

El sistema de propagación vegetativa por cormos, usado normalmente en la mayoría de las aráceas comestibles, ha contribuido a que los agricultores sufran serias pérdidas por la diseminación y generalización de enfermedades, entre las que se destacan las infecciones virales, siendo el Virus del Mosaico de la Malanga (DMV) el de mayor relevancia (Hartman, 1974).

En Costa Rica la incidencia de DMV en las plantaciones comerciales de tiquisque es de por

lo menos 80% (Ramírez, 1987). En las plantas en que se observa una sintomatología severa, se presenta una merma en la producción de un 24% en tiquisque blanco y un 47% en tiquisque morado (Monge y Arias, 1984).

La obtención de plantas libres de virus es, por lo tanto, fundamental si se quieren optimizar los rendimientos en los lotes comerciales. En este sentido el cultivo *in vitro* de ápices es un método rápido y eficiente para la obtención de material sano y genéticamente idéntico. Esta técnica se fundamenta en el hecho de que la distribución del virus en los tejidos de la planta infectada es desuniforme, y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia los ápices de las plantas, por lo que las probabilidades que las células meristemáticas estén libres de partículas virales son mayores que las de los tejidos más diferenciados (Bhojwani y Razdan, 1983; Kartha, 1981).

El objetivo de este trabajo fue obtener plantas de tiquisque blanco, de tiquisque morado y de ñampí libres de virus mediante el cultivo aséptico de ápices caulinares.

1/ Recibido para su publicación el 11 de noviembre de 1986.

* Parte de la tesis de Licenciatura en Fitotecnia presentada por el primer autor a la Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

** Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

*** Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

Se sembraron secciones de cormos de tiquisque blanco, de tiquisque morado y de ñampí, infectados con DMV, en camas de arena bajo condiciones de invernadero. Luego de 45 días los brotes de las tres especies se llevaron al laboratorio y se sumergieron en una solución 1:1 de benomil y estreptomycinina en dosis de 2 g/L, con agitación constante y por espacio de 15 minutos, al cabo de los cuales se colocaron en alcohol de 70° durante un minuto. Inmediatamente después se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 1,25%, donde permanecieron por 15 minutos con agitación continua. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Se procedió a la extracción de los ápices con dos o tres primordios foliares dentro de una cámara de flujo laminar y con la ayuda de un estereoscopio, pinzas de punta fina y un escalpelo.

Los ápices se inocularon en tubos de ensayo de 18 x 150 mm conteniendo 15 ml del medio de Murashige y Skoog, solidificado con 0,8% de agar y suplementado con 0,4 mg/L de tiamina HCl, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 0,5 mg/L de piridoxina HCl, 100 mg/L de inositol, 3% de sacarosa, cinco niveles de ácido indolacético o AIA (0, 10, 15, 20 y 25 mg/L) y cinco niveles de kinetina (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L) para un total de 25 tratamientos y 15 repeticiones para cada una de las especies en estudio.

Los ápices se incubaron por seis meses en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas, una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E}/\text{seg}/\text{m}^2$ y a una temperatura de $26,5\text{ C} \pm 1,5\text{ C}$.

Los cultivos se observaron cada dos meses, evaluándose la producción de plántulas a través del tiempo de cultivo.

La sanidad (presencia de virus) del material producido *in vitro* (350 plantas) se evaluó por el método de tinción de las inclusiones citoplasmáticas y su posterior observación al microscopio de luz descrito por Christie y Edwardson (1977).

Las plantas enfermas se eliminaron luego del análisis y aquellas que se identificaron como sanas se llevaron al invernadero, se transplantaron a un sustrato estéril compuesto por vermiculita y arena en una proporción 3:1, y se cubrieron con vasos plásticos para mantener una alta humedad relativa. Luego de ocho días los vasos se perforaron para re-

ducir gradualmente la humedad y ocho días después se eliminaron del todo.

Las plantas se fertilizaron semanalmente con solución nutritiva Hoagland al 50%.

Al cumplirse los 45 días se transplantaron a un sustrato constituido por suelo y piedra pómez en una relación de 3:1, donde permanecieron por dos meses antes de ser llevadas al campo.

RESULTADOS

Efecto de los reguladores

La Figura 1 muestra el porcentaje de plántulas de tiquisque blanco formadas, según el tratamiento hormonal, al cabo de cuatro meses de cultivo *in vitro*. En general se observa que los niveles intermedios y altos de AIA (15 y 25 mg/L) favorecieron el crecimiento de los explantes. El efecto de la citocinina no se manifestó de manera consistente.

Las Figuras 2 y 3 muestran el efecto de los diferentes tratamientos hormonales sobre la formación de plantas de tiquisque morado y de ñampí, respectivamente. En ambas especies se nota respuesta a las concentraciones intermedias y altas de AIA (10 mg/L y 25 mg/L), no así hacia la kinetina que resultó además inhibitoria en los niveles altos de 1,0 y 2,0 mg/L.

Efecto del tiempo

La Figura 4 presenta el efecto del tiempo de cultivo sobre el número de plantas obtenidas en las tres especies estudiadas en los mejores tratamientos. En el caso del tiquisque morado (Figura 4a) se observa que el mayor número de plántulas (73%) se obtiene a los dos meses de inoculados los ápices. En el caso del ñampí (Figura 4b) y del tiquisque blanco (Figura 4c) la mayor producción (67% y 60% respectivamente) se obtuvo a los cuatro meses de iniciado el experimento.

Prueba de sanidad y acondicionamiento en invernadero

Esta prueba de sanidad vegetal, mediante el método de tinción de inclusiones citoplasmáticas reveló que un 90% (315) de las plantas obtenidas mediante el cultivo de ápices estaban libres de virus, mientras que en un 10% (35) de ellas se detec-

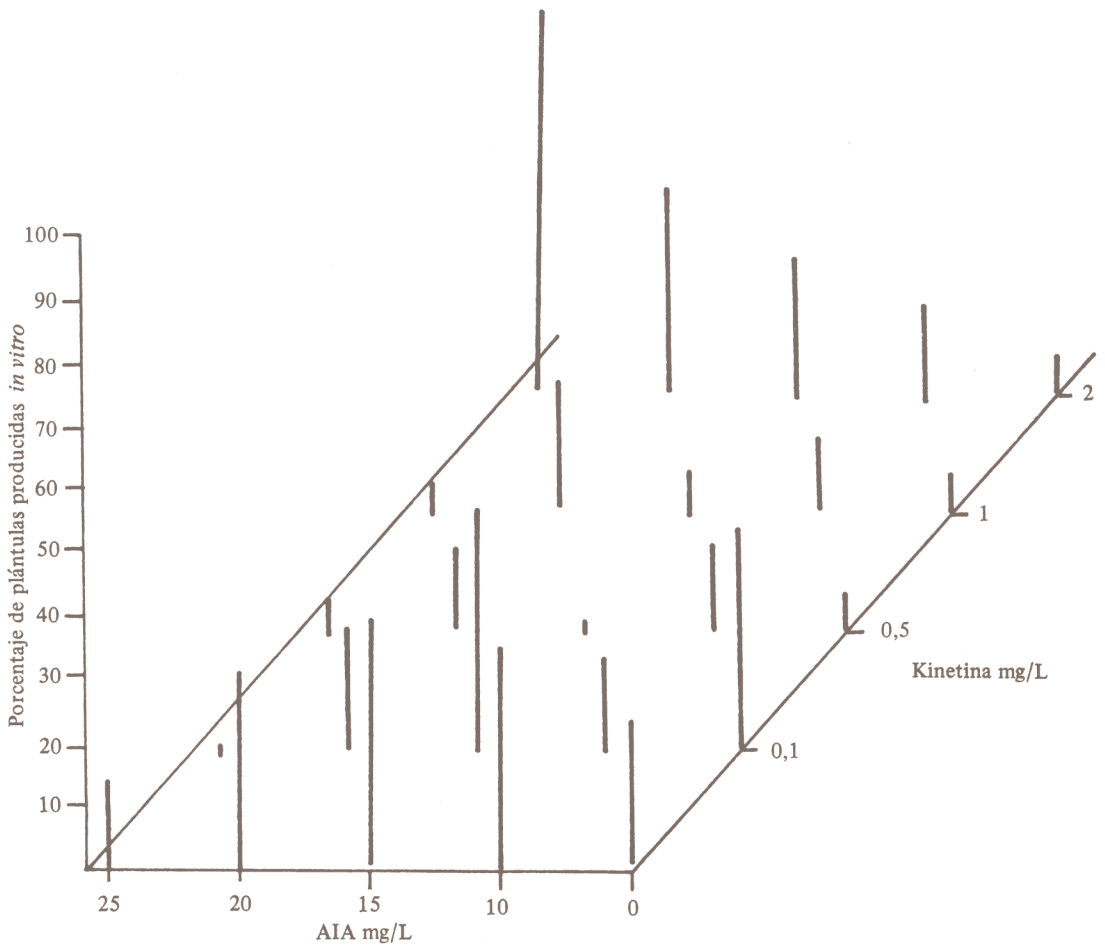


Fig. 1. Porcentaje de ápices de tiquisque blanco por tratamiento que desarrollaron plántulas completas en cuatro meses de cultivo *in vitro*.

taron inclusiones características de la presencia del virus (Figuras 5 y 6).

De las plantas transferidas al invernadero se obtuvo la aclimatación del 95% de ellas en un plazo de 45 días (Figura 7) que después de 105 días pudieron llevarse al campo.

La Figura 8 resume el método y los resultados que se obtuvieron al utilizar esta técnica en la producción de plantas libres de virus.

DISCUSION

Las pruebas para determinar el balance adecuado de reguladores de crecimiento que condujera a la regeneración de plantas, mostraron que las tres especies en estudio requieren de altos niveles de auxina para promover un apropiado

desarrollo de los explantes (Figuras 1, 2 y 3). Por el contrario, en lo que a la concentración de citocinina se refiere, no hubo una respuesta significativa del tiquisque morado ni del ñampí hacia este fitoregulador siendo en altas concentraciones (1,0 mg/L y 2,0 mg/L) inhibitorio para el desarrollo de los ápices. En el caso del tiquisque blanco, la respuesta a la kinetina es irregular y no permite establecer un adecuado patrón de comportamiento hacia esta sustancia.

La dependencia hacia la auxina, que mostraron los ápices de las tres especies es coincidente con los resultados obtenidos por Smith y Murashige (1970) quienes trabajaron con ápices y meristemas de varias angiospermas. Estos autores determinaron que la provisión de auxina es esencial para el desarrollo de estos tejidos, y concluyeron que el

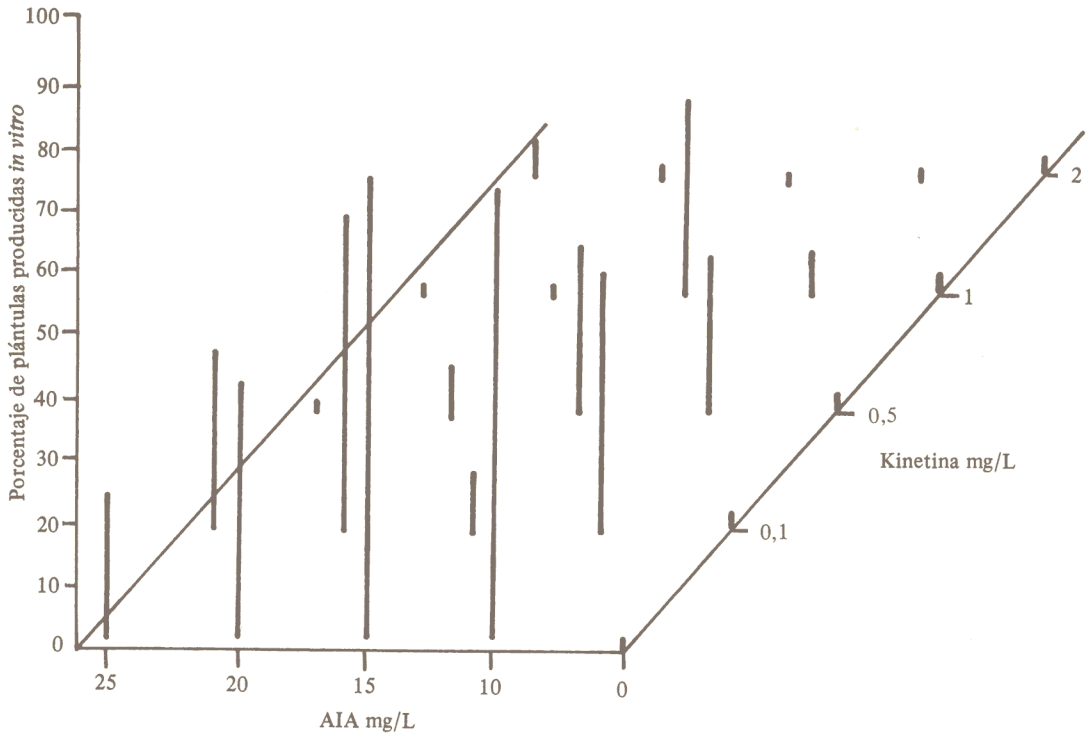


Fig. 2. Porcentaje de ápices de tiquisque morado por tratamiento que desarrollaron plántulas completas en cuatro meses de cultivo *in vitro*.

meristema apical no es por sí mismo una fuente de auxina sino que este regulador parece ser producido por los primordios foliares y las hojas más jóvenes.

Respecto al nivel de kinetina (Bhojwani y Razdan, (1983) y Shabde y Murashige (1977) y Smith y Murashige (1970), concuerdan con que la citocinina exógena es innecesaria y que la independencia de los ápices hacia ésta se debe a que el tejido posee un adecuado nivel endógeno.

La velocidad de crecimiento de los ápices varió de especie a especie siendo el tiquisque morado el más precoz, con un 70% de plántulas producidas a los dos meses de cultivo en el mejor de los tratamientos (Figura 4a). El ñampí y el tiquisque blanco requirieron cuatro meses para llegar a la máxima producción de plantas (67% y 60%, respectivamente), como se nota en las Figuras 4b y 4c. Estas diferencias en crecimiento a través del tiempo se deben posiblemente a la interacción del genotipo con el medio, en donde se incluye la respuesta diferencial de cada una de las espe-

cies al balance hormonal, que lejos de ser estático es un fenómeno dinámico. Según Shabde y Murashige (1977) esta respuesta puede variar con la especie aún bajo las condiciones de cultivo más controladas.

Los resultados de la prueba de sanidad permiten considerar al cultivo *in vitro* de ápices como un medio eficiente para limpiar plantas afectadas por el virus del mosaico de la malanga que es la principal limitante para el cultivo de las aráceas comestibles en Costa Rica.

De acuerdo al porcentaje de plantas sanas obtenidas (90%) así como a los altos porcentajes de regeneración de plántulas (Figura 4), se puede afirmar que el tamaño de ápice seleccionado con fines fitosanitarios fue el adecuado. Al respecto, Villalobos (1979) considera que el factor más importante a la hora de seleccionar el tamaño del ápice apropiado lo constituye la sanidad, ya que a medida que se disectan tejidos más grandes se aumentan las posibilidades de contaminación por parte del virus. Además, el tamaño del

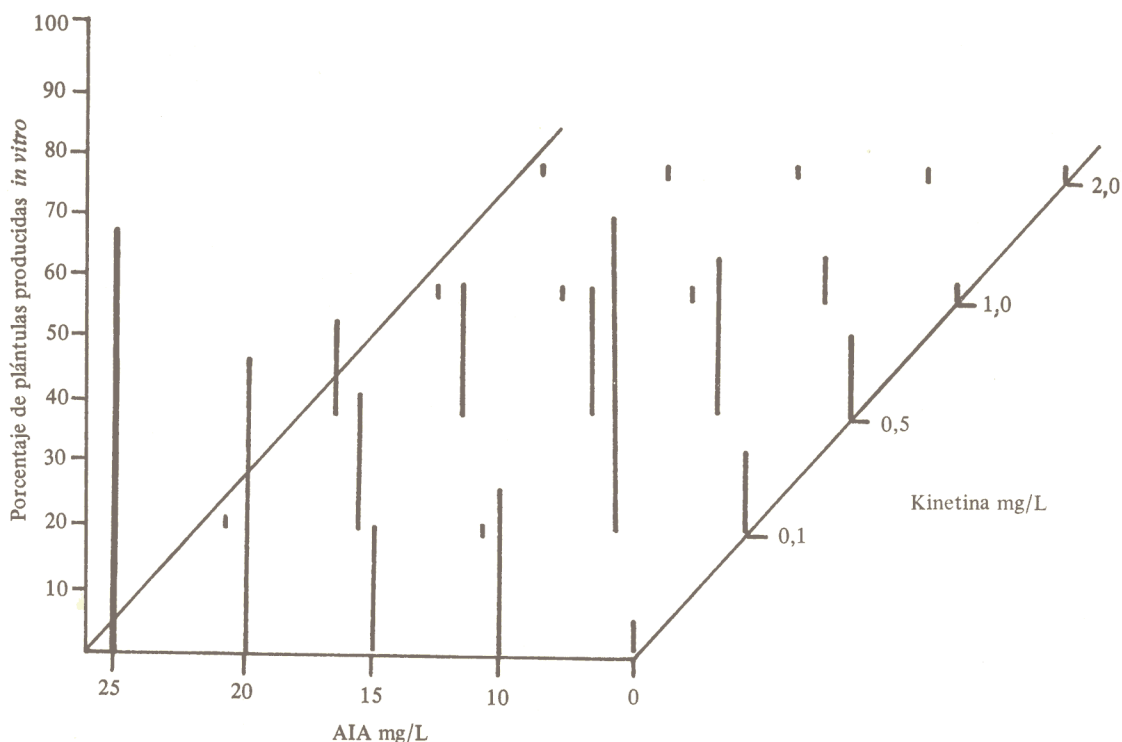


Fig. 3. Porcentaje de ápices de ñampí por tratamiento que desarrollaron plántulas completas en cuatro meses de cultivo *in vitro*.

explante es fundamental desde el punto de vista del contenido endógeno y de la síntesis de reguladores del crecimiento, así como en la organogénesis de meristemas aislados.

El comportamiento de las plantas durante el proceso de aclimatación a condiciones no estériles fue adecuado, obteniéndose un 95% de éxito en el trasplante al invernadero. Este resultado obedeció principalmente a la rusticidad característica de las aráceas, al uso de un sustrato permeable que no permitió pudriciones radicales y al mantenimiento de una alta humedad relativa durante los días posteriores al trasplante. El último aspecto es importante ya que las plantas producidas *in vitro* presentan características que las hacen sensibles a la pérdida de agua, como es poseer grandes espacios intercelulares en el mesófilo de empalizada, baja frecuencia de estomas y una disminución o ausencia total de ceras en la cutícula de las hojas.

Los resultados de esta investigación revelan la gran posibilidad de utilizar las técnicas de cultivo *in vitro* para la producción de semilla sana, libre

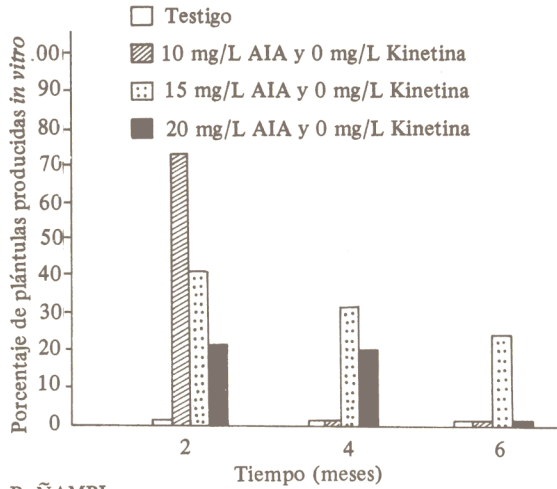
de DMV que pueda usarse como material básico para un programa de producción de semilla en aráceas, y en el saneamiento de otras especies afectadas por virus como la papa, la yuca, la fresa, los cítricos, etc.

RESUMEN

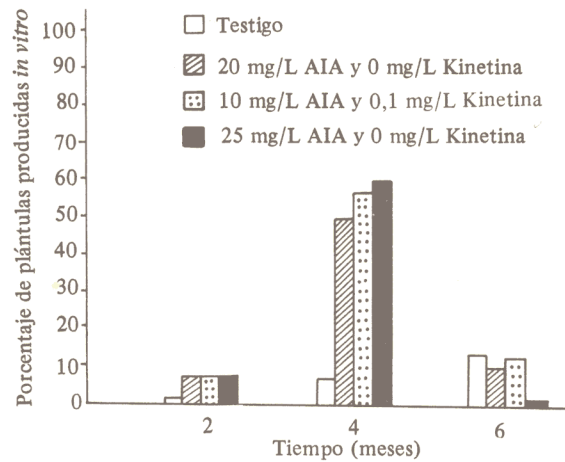
Apices caulinares de plantas de tiquisque blanco, de tiquisque morado y de ñampí, se inocularon en tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado, solidificado con 0,8% de agar y suplementado con cinco niveles de ácido indolacético o AIA (0, 10, 15, 20 y 25 mg/L) y cinco de Kinetina (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L para un total de 25 tratamientos).

La evaluación de los cultivos reveló que las combinaciones hormonales de 15 mg/L de AIA y 2,0 mg/L de kinetina fueron las que mejor favorecieron en tiquisque blanco la regeneración de plántulas, mientras que para tiquisque morado 10 mg/L de AIA solo y para ñampí 25 mg/L de AIA resultaron ser los tratamientos más favorables.

A. TIQUISQUE MORADO



B. ÑAMPI



C. TIQUISQUE BLANCO

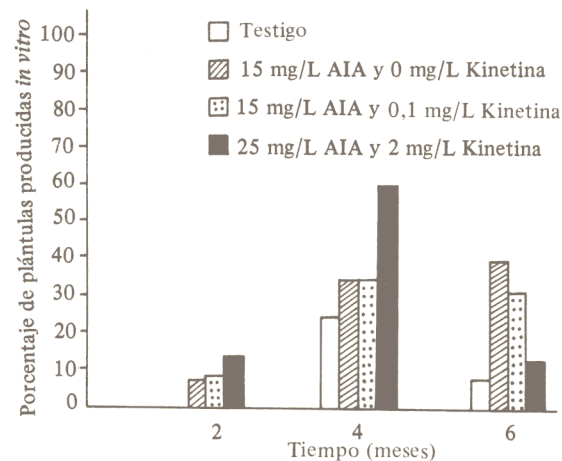


Fig. 4. Distribución porcentual en el tiempo de la producción *in vitro* de plántulas en los mejores tratamientos de tres aráceas comestibles.

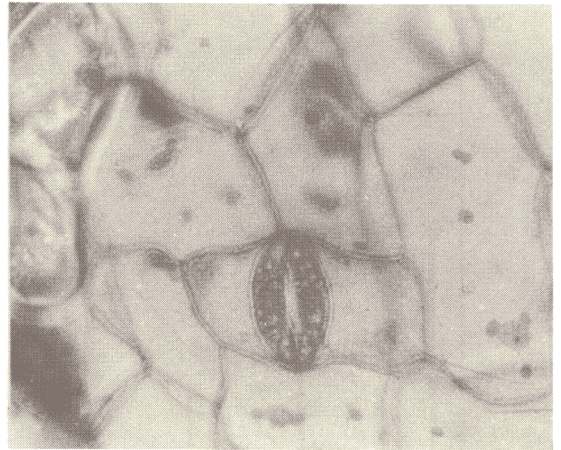


Fig. 5. Células de tiquisque blanco sanas. Nótese la presencia del núcleo, nucléolo y algunos plastidios (Aumento: 400 X).

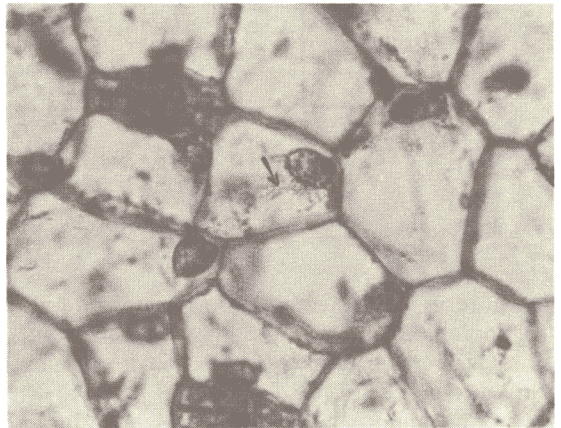


Fig. 6. Células de tiquisque blanco infectadas con DMV. Obsérvese el oscurecimiento del citoplasma y las masas cristalinas o inclusiones (Aumento: 630 X).

Las pruebas de sanidad del material producido mediante la técnica de tinción de las inclusiones citoplasmáticas reveló que un 90% de las plántulas obtenidas estaban libres del virus del Mosaico de la Malanga (DMV).

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo de Canadá (CIID), como parte del programa "Cultivo de Tejidos Calgary/Costa Rica". Los autores desean dejar constancia de su gratitud por la cooperación y asistencia de esta institución.

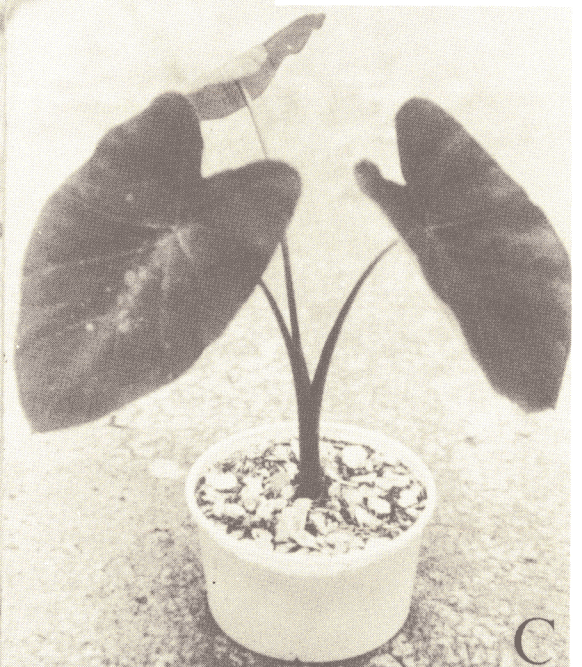
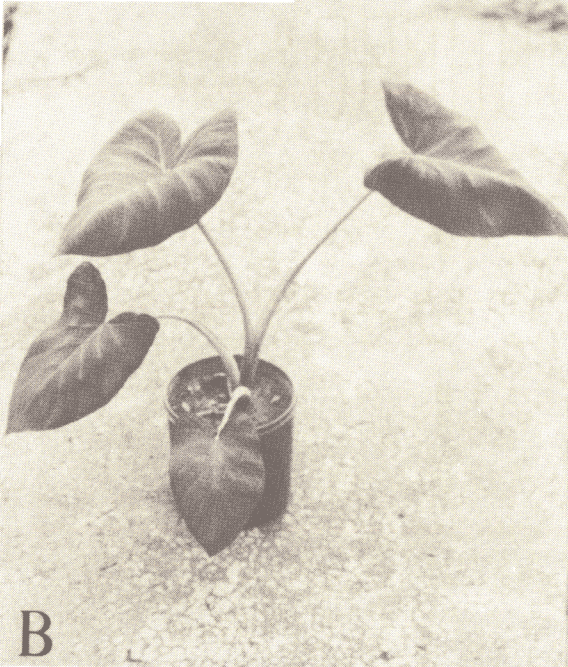


Fig. 7. Fases del proceso de aclimatación en el invernadero. A—Plántulas mostrando tres estados de desarrollo. B—Planta de tiquisque blanco lista para llevarse al campo. C—Planta de ñampí lista para llevarse al campo.

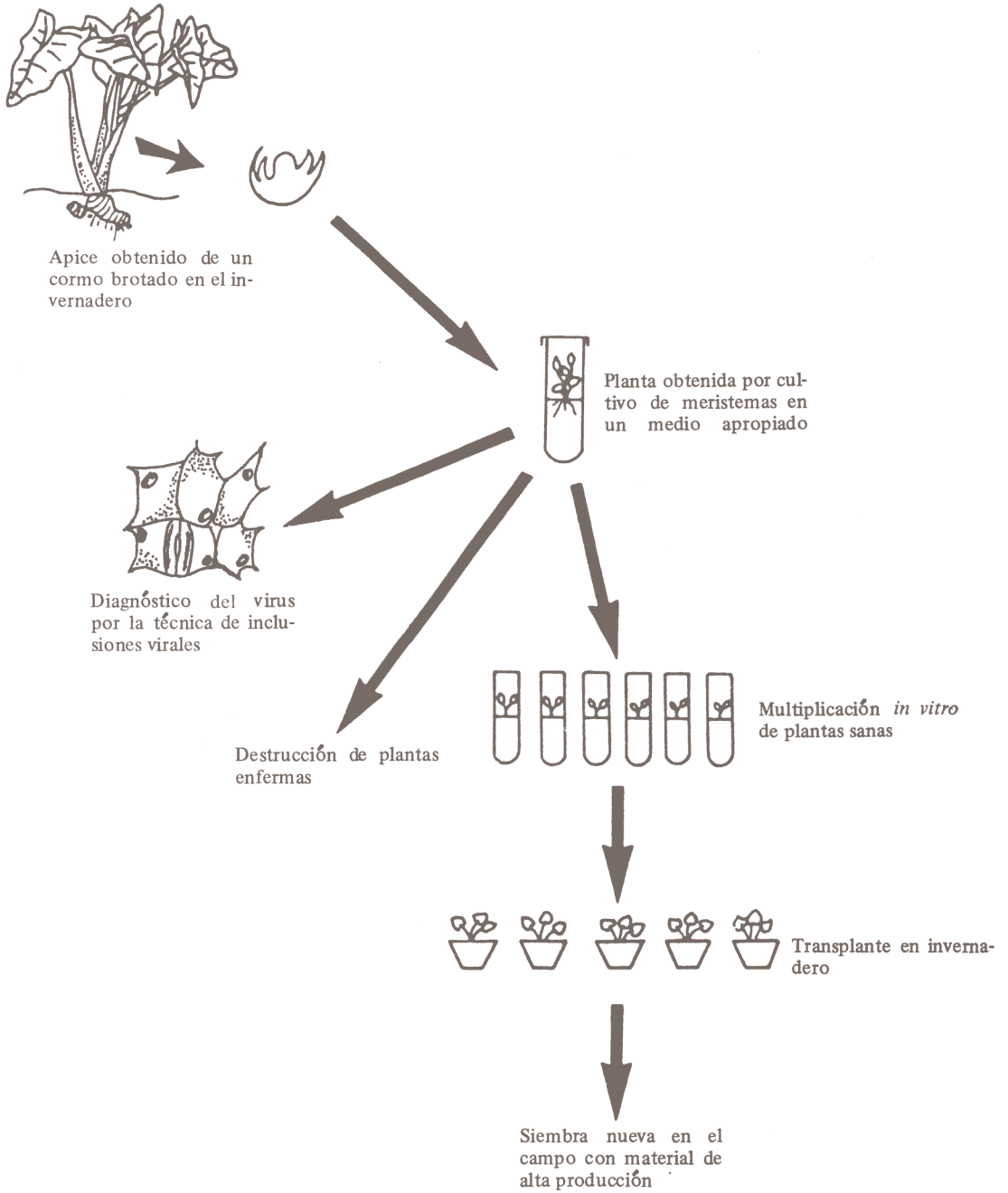


Fig. 8. Resumen del procedimiento para la obtención de plantas de tiquisque y ñampi libres de virus.

LITERATURA CITADA

- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. 1983. Plant tissue culture: theory and practice. New York, Elsevier. 502 p.
- CHRISTIE, R. G.; EDWARDSON, J. R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agricultural Experiment Stations. Monograph Series no. 9. 155 p.
- HARTMAN, R. D. 1974. Dasheen mosaic virus and other phytopathogens eliminated from caladium, taro, and cocoyam by culture of shoot tips. *Phytopathology* 64: 237-240.
- KARTHA K. 1981. Meristem culture and cry preservation methods and applications. *In* Plant tissue culture; methods and applications in agriculture. Ed. by T. Thorpe. New York, Academic Press. p. 181-212.
- MONGE, M.; ARIAS, O. 1984. Efecto sobre el rendimiento del virus del Mosaico en tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*) *In* Congreso Agronómico Nacional (6, 1984, San José). Resúmenes, San José p. 197-198.
- RAMIREZ, P. 1987. Aislamiento y caracterización del virus del mosaico del "Dasheen" (DMV) en Costa Rica. 10 p. (en prensa).
- SHABDE, M.; MURASHIGE, T. 1977. Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem *in vitro*. *American Journal of Botany* 64 (4): 443-448.
- SMITH R.; MURASHIGE T. 1970. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. *American Journal of Botany* 57(5): 562-568.
- VILLALOBOS, V. 1979. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) libres de virus por cultivo *in vitro* de mersistemas y ápices vegetativos. Tesis Mag. Sc. Chapingo, México, Colegio de Graduados. 94 p.