

ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACION *IN VITRO* DE CUATRO GENOTIPOS DE ÑAMPI (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*)¹

Luis Gómez *
Francisco Saborío *
Ileana Salazar *
Oscar Arias *
Trevor Thorpe **

ABSTRACT

Establishment and multiplication of four genotypes of taro (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*) *in vitro*. Four genotypes of taro were established and multiplied *in vitro*. A modified Murashige and Skoog medium (MS) plus 25 mg/L of AIA was used to establish and develop the plants. MS containing 0.05 mg/L of AIA and 1 mg/L of BAP was used for their multiplication. Plant regeneration rate varied between 76% and 88%. The number of sprouts per plant, for each 7 weeks of culture, varied between 6.8 and 11.9. Elisa-radioinmunoassay (RIA) diagnosis showed that 83% of the plants coming from cormels were infected with Dasheen Mosaic Virus (DMV), while plants arising from shoot tip culture of the same group of cormels were virus free.

INTRODUCCION

La malanga o taro (*Colocasia esculenta* Schott) pertenece a la familia Araceae. Es originaria de la parte sur central de Asia, probablemente de India y Malasia. La taxonomía de la malanga es confusa, pero en general se reconocen 2 grupos principales: el tipo *eddoe*, en el cual el cormo de la planta es esférico y produce cormelos de forma ovoide que constituyen el principal producto de este cultivo; y el tipo *dasheen*, en el que el cormo es cilíndrico y de mayor tamaño y por lo general no produce cormelos de valor comercial. El primer tipo es conocido como ñampí o chamol (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*) y el segundo como malanga (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). En general se conocen con nombres

comunes como: malanga, taro, cocoyam, eddoe, dasheen, malanga china, ñampí y chamol (Montaldo, 1977; Onweme, 1978; Wang, 1983). Actualmente se cultivan como una fuente importante de alimento e ingreso en diversas regiones tropicales y subtropicales (Wang, 1983). En América su cultivo se efectúa principalmente en las islas del Caribe, Venezuela y Centro América (Montaldo, 1977).

En ñampí se han desarrollado sistemas de cultivo *in vitro* con diferentes objetivos, entre ellos: la obtención de plantas libres de virus, con énfasis en el virus del mosaico de la malanga o DMV (Dasheen Mosaic Virus) (Hartman, 1974; Jackson *et al.*, 1977; Monge *et al.*, 1987); la micropropagación (Abo-El Nil y Zettler, 1976; Jackson, Ball y Arditti, 1977; Gómez *et al.*, 1989); la conservación de germoplasma (Staritsky, 1980) y la selección de plantas tolerantes a la salinidad (Nyman, González y Arditti, 1982). Sin embargo, se ha observado una alta especificidad de los cultivares de malanga y en general de las aráceas, en los requerimientos para su cultivo *in vitro* (Arditti y Strauss, 1979).

1/ Recibido para publicación el 11 de setiembre de 1990.
* Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica
** Department of Biology, University of Calgary. Calgary, Alberta, Canadá T2N 1N4.

Recientemente, Zettler y Hartman (1987) señalaron que la existencia de innumerables cultivares de los géneros *Colocasia* y *Xanthosoma* creciendo en diversas partes del mundo y en áreas relativamente pequeñas, representa uno de los factores que limitan la aplicación comercial de la técnica del cultivo *in vitro* en estas plantas, debido al alto costo para el establecimiento de cada cultivar.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de cuatro genotipos de ñampí (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*) durante las fases de establecimiento y de multiplicación, en 2 medios de cultivo previamente establecidos (Monge *et al.*, 1986; Gómez *et al.*, 1989).

MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con cuatro genotipos de *C. esculenta* var. *antiquorum* conocida localmente como ñampí o chamol; denominados 6117, 6315, 8987 y Local (sembrado ampliamente en el país). El material vegetal utilizado en esta investigación fue suministrado por la Sede Regional del Ministerio de Agricultura y Ganadería en San Carlos, Alajuela, Costa Rica. Estos genotipos sobresalieron en productividad en una prueba de campo, donde se evaluaron junto a otros 10 (Rodríguez, 1984).

En todos los genotipos estudiados se indujo la brotación de los cormelos bajo dos sistemas: a) bolsas plásticas y b) sembrados en bandejas plásticas con suelo como sustrato. Una vez que los brotes alcanzaron un tamaño apropiado (Figura 1A) se separaron de los cormelos; luego, se les practicaron 2 cortes transversales, a cada extremo, y 4 cortes longitudinales, a cada lado, hasta obtener las porciones que se muestran en la Figura 1B, donde está el ápice. Se procedió a lavar las porciones con agua y posteriormente se colocaron en una solución 1:1 de benomil y estreptomycin más terramicina en dosis de 2 g/L por espacio de 15 minutos y en agitación constante. Después se desinfectaron por inmersión en etanol de 70° durante un minuto e inmediatamente se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 1,25%, donde permanecieron en agitación constante durante 15 minutos. Finalmente, se lavaron con agua destilada estéril 3 veces dentro de una cámara de flujo laminar, en la cual se realizó la extracción de los ápices con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Los ápices consistieron del domo más 1 ó 2 primordios foliares y se incubaron a la luz en tubos de cultivo (18x150 mm) con 10 ml de medio, durante la etapa de establecimiento y desarrollo de las plantas. Después de 3 meses se inició la etapa de multiplicación. Se tomaron plantas y se les eliminaron las raíces y la parte aérea (incluida la yema terminal) dejando únicamente la porción basal. Estas porciones se cultivaron en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad a los cuales se les adicionó 25 ml de medio. El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS) (1962) con 3% de sacarosa, suplementado con 25 mg/L de ácido indolacético (AIA) en la etapa de establecimiento y desarrollo de las plantas y con 1 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) más 0,05 mg/L de AIA en la etapa de multiplicación. El pH de los medios se ajustó a 5,7 previo a la esterilización en autoclave y se solidificaron con agar (Sigma Chemical Company) en concentración de 0,8%, en la primera etapa y "Gelrite" (Kelco Scientific) en concentración de 1,8 g/L en la segunda. Los medios se esterilizaron en autoclave a 1,2 kg/cm² de presión y a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Se cultivó un ápice por tubo de ensayo y 4 secciones basales por frasco de 120 ml en condiciones de laboratorio (25±2°C), con un fotoperíodo de 12 horas y una intensidad lumínica de aproximadamente 40 µe/s/m². Los ensayos fueron repetidos al menos 3 veces en la etapa de establecimiento y por lo menos 2 veces en la etapa de multiplicación. Se utilizaron 15 repeticiones por genotipo en la primera etapa y un número variable en la segunda. Los ciclos de multiplicación fueron de 7 semanas, según la metodología propuesta por Gómez *et al.* (1989).

Se evaluó la presencia del DMV en las plantas producidas *in vitro* y las plantas desarrolladas en invernadero, ambas provenientes del mismo lote de cormelos. Para esto se utilizó la técnica de Elisa-radioinmunoensayo (RIA) (Hunter, 1978) estandarizada por Salazar (1989; 1991) para el DMV. Se utilizaron 10 plantas provenientes del cultivo de tejidos y 3 provenientes de cormelo; en éste último caso se procesaron 2 muestras por planta.

También se midió la altura de las plantas (desde su base hasta la inserción de la segunda hoja bien desarrollada) y el porcentaje de plantas que presentaban al menos un brote adicional (% brotación axilar), a los 60 días después de iniciada la etapa de establecimiento.

Cuadro 1. Comportamiento de los ápices de ñampí provenientes de 4 cultivares, incubados sobre el medio MS + 25 mg/L de AIA. Resultados a los 60 días de incubación.

Cultivar	No. de ápices incubados	% de ápices que forman plantas	Altura de planta (cm)	Brotación axilar (%)
MM-6117	15	70+15*	2,30	31
MM-6315	15	75+13	2,69	50
MM-8987	15	56+20	1,97	17
Local	15	72+11	2,80	0

* Promedio y desviación estándar de por lo menos 3 repeticiones.

RESULTADOS

Etapas de establecimiento

El Cuadro 1 muestra el comportamiento *in vitro* de los 4 genotipos de ñampí en el medio MS + 25 mg/L de AIA, después de 60 días de incubación. El porcentaje promedio de ápices que formaron plantas varió entre 56% y 75%. Fue posible aumentar este porcentaje mediante un manejo cuidadoso del material. La baja respuesta de los ápices en algunos tratamientos se debió al daño sufrido por éstos durante la disección y no a su inhabilidad de crecer por efecto del medio de cultivo.

Quince días después de establecidos los ápices se tornaron verdes y se produjo un engrosamiento en la base donde se forma un callo de apariencia cristalina y de textura friable, proveniente de las células exteriores y que aparentemente no comprende el domo apical. Posteriormente, el meristema se desarrolló quedando el callo en la base de la nueva planta (Figura 1C).

Se observaron diferencias entre genotipos en la altura y el porcentaje de plantas que presentaron al menos un brote adicional (Cuadro 1, Figura 1C). El genotipo Local presentó la mayor altura pero un porcentaje de brotación lateral de cero.

Las plantas enraizaron sin problemas, en el mismo medio, después de 60 días de cultivo. La Figura 1D muestra plantas del genotipo MM-8987 listas para su transferencia a condiciones de invernadero.

Multiplicación

Todos los genotipos presentaron desarrollo de brotes axilares en el medio MS + 1 mg/L de BAP + 0,05 mg/L de AIA (Cuadro 2). Se observaron diferencias entre genotipos en el número de

brotes producidos. El genotipo MM-8987 fue el más prolífico con un promedio de 11,9 brotes por planta, seguido del MM-6315 con 9,1 brotes. El genotipo local fue intermedio (8,0 brotes por planta) y los resultados más bajos (6,8 brotes/planta) se obtuvieron con el genotipo MM-6117.

Sanidad

El Cuadro 3 muestra el número de plantas en las que se detectó el DMV antes y después de su paso por cultivo *in vitro* utilizando la técnica de RIA. El 83% de las plantas provenientes de cormelo estaban infectadas con el DMV, mientras que no se detectó en ningún caso el virus en las plantas obtenidas por cultivo de ápices *in vitro*.

Establecimiento de las plantas en condiciones de invernadero

Para el establecimiento de las plantas producidas *in vitro* a condiciones de invernadero se siguió la metodología de (Gómez *et al.*, 1989). El 100% de las plantas sobrevivieron en esta condición (Figura 1F). Queda por evaluar el desarrollo de los genotipos en esta condición y su posterior comportamiento en el campo.

DISCUSION

A menudo los modelos de propagación *in vitro* son desarrollados y descritos para un solo genotipo (cultivar) de una especie en particular. Cuando se tratan de propagar otros genotipos según el modelo descrito, los requerimientos de reguladores de crecimiento pueden ser muy diferentes de un genotipo (cultivar) a otro en una misma especie (Pierik, 1988). En *C. esculenta* este hecho se agrava con la existencia de dos variedades botánicas *C. esculenta* var. *antiquorum* y *C. esculenta* var. *esculenta*, cuyos requerimientos para su cultivo *in vitro* son muy diferentes (Arditti y Strauss, 1979). Inclusive se ha sugerido que esta marcada diferencia puede apoyar el intento de clasificar estas plantas en dos especies (Arditti y Strauss, 1979), como se pretendió en un principio (Montaldo, 1979). La mayoría de los trabajos publicados antes de 1980, sobre el cultivo de tejidos de malanga, no indican el genotipo con que se trabajó. Arditti y Strauss (1979) intentaron establecer la identidad de los materiales utilizados por autores precedentes. Según los resultados descritos, se presentan

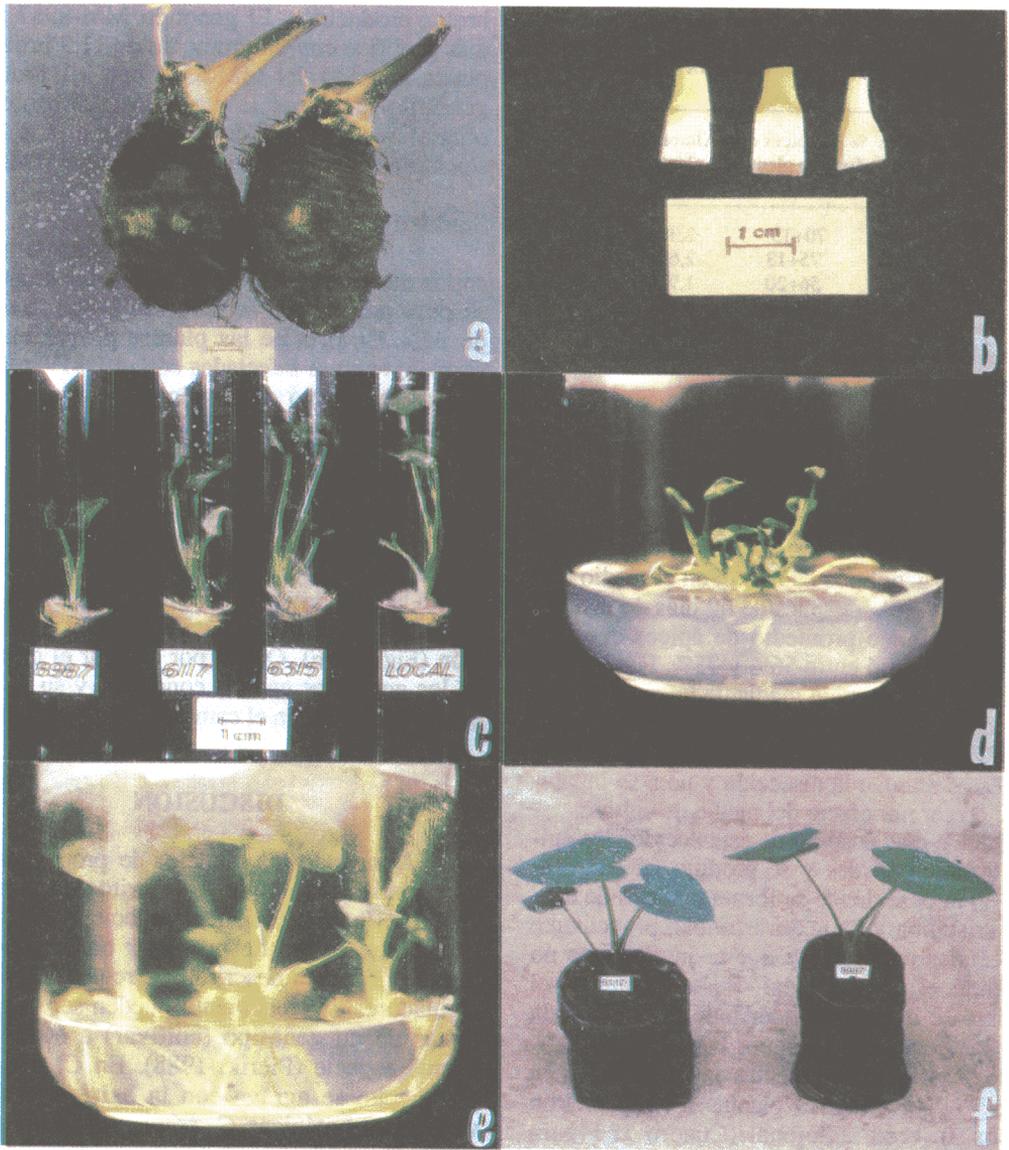


Fig. 1. Regeneración de plantas de cuatro cultivares de ñampí por cultivo de ápices. A) Cormelos brotados del genotipo local. B) Explantes antes de la esterilización superficial. C) Plántulas obtenidas en un medio MS + 25 mg/L de AIA, 60 días de incubación. D) Producción de brotes laterales en el medio de multiplicación. E) Plántulas completas del genotipo MM-8987 listas para su transferencia a condiciones de invernadero. F) Plantas de los genotipos 6117 y 8987, 30 días después de su transplante al invernadero.

variaciones en el comportamiento *in vitro* de los cultivares de ñampí. Esto concuerda con las diferencias observadas entre genotipos en la altura y la producción de nuevos brotes (Cuadros 1 y 2). El genotipo Local, con el que se desarrollaron los medios para establecimiento (Monge *et al.*, 1987) y multiplicación (Gómez *et al.*, 1989), presentó la

mayor altura, ausencia de brotación lateral y un número de brotes por planta intermedio en la etapa de multiplicación. El porcentaje de regeneración de plantas obtenido en los 4 genotipos, así como su multiplicación posterior indican, sin embargo, que en el caso de los genotipos empleados en este experimento, los medios utilizados

Cuadro 2. Tasa de multiplicación de 4 genotipos de ñampí, incubados en el medio MS + 0,01 mg/L de AIA + 1 mg/L de 6-BAP. Resultados a los 49 días de incubación.

Cultivar	No. de plántulas iniciales	No. de brotes total	No. brotes/plántula
MM-6117	12	82	6,8
MM-6315	11	100	9,1
MM-8987	9	107	11,9
Local	2	19	8,0

tuvieron un rango amplio de aplicación. Resultados similares fueron obtenidos por Acheampong y Henshaw (1983) con genotipos de tiquisque (*Xanthosoma* spp.).

Las plantas se obtuvieron por medio de lo que Hicks (1984) llama organogénesis directa: crecimiento del ápice hasta formar una planta sin pasar por la etapa de callo. Esto es preferible porque se obtiene una mayor estabilidad genética. La multiplicación posterior de las plantas se logró mediante la proliferación de yemas axilares y tampoco incluyó la formación de callo, fase presente en estudios realizados por Abo-El Nil y Zettler (1976) en este cultivo.

La prueba viral para evaluar la presencia del DMV demostró que todos los genotipos provenientes del campo estaban infectados, lo que confirma la amplia distribución de este virus. Altas incidencias del DMV también han sido encontradas en colecciones de germoplasma de *Colocasia* y *Xanthosoma* en Puerto Rico (Alconero y Zettler, 1971) y en Venezuela (Debrott y Ordosgoitti, 1974). Por otra parte, el hecho de que no se encontró el virus en las plantas producidas *in vitro* confirma la efectividad de la técnica como método de limpieza para este patógeno (Monge *et al.*, 1987; Hartman y Zettler, 1988).

Los genotipos evaluados en el presente estudio mostraron una alta producción de cormelos (21-22 t/ha) en una prueba de campo previa, en la que no se hizo referencia al DMV (Rodríguez, 1984). Esto hace suponer, que el potencial productivo de estos genotipos aún no se ha expresado totalmente (Monge *et al.*, 1986) y que existe variación entre genotipos en relación a su tolerancia al DMV. Al respecto, Liu *et al.* (1982) observaron diferencias en la expresión de síntomas del DMV en plantas de tiquisque (*Xanthosoma* spp.) provenientes de cultivo de tejidos.

Cuadro 3. Detección del DMV en plántulas producidas *in vitro* y provenientes de cormelo de 4 genotipos de ñampí, mediante RIA.

Cultivar	Número de plantas positivas/ total de plantas evaluadas	
	Cormelo*	<i>in vitro</i>
MM-6117	3/3	0/10
MM-6315	1/3	0/10
MM-8987	3/3	0/10
Local	3/3	0/10
Total	10/12	0/40
(%)	83	0

* Promedio de 2 repeticiones.

En relación a la técnica de detección viral utilizada (RIA), cabe señalar que es capaz de detectar la presencia del virus en términos de nanogramos; permite procesar un gran número de muestras de manera rápida y objetiva y obviar el problema de la fluctuación de la sintomatología observada en este virus (Zettler y Hartman, 1988). Es posible, entonces, confirmar plantas libres del DMV, lo que reviste singular importancia para el intercambio internacional de germoplasma y el establecimiento de un programa de producción de semilla asexual de ñampí y otras aráceas comestibles libres de virus.

RESUMEN

Se establecieron y multiplicaron *in vitro* 4 genotipos de ñampí (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum* Schott). Para el establecimiento y desarrollo de las plantas se utilizó un medio Murashige y Skoog (1962) modificado (MS) más 25 mg/L de AIA. En la etapa de multiplicación se empleó un MS más 0,05 mg/L de AIA y 1 mg/L de BAP. El porcentaje de regeneración de plantas varió de un 76% a un 88%. El número de brotes por planta estuvo entre 6,8 y 11,9, en ciclos de multiplicación de 7 semanas.

Según el diagnóstico viral, con la prueba de Elisa-radioinmunoensayo (RIA), el 83% de las plantas provenientes de cormelo estaban infectadas con el DMV, mientras que no se detectó el virus en las plantas obtenidas *in vitro*, a partir de ápices provenientes del mismo lote de cormelos.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo de Canadá (CIID). Los autores desean dejar constancia de su gratitud por la cooperación y asistencia de esta institución. También agradecen al Dr. F.W. Zettler de la Universidad de Florida, Gainesville, quien gentilmente facilitó el anticuerpo policlonal contra el DMV; al Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico de la Universidad de Louisiana en Costa Rica (ICRMT-LSU) por facilitar el equipo y las instalaciones para el diagnóstico viral y a la señora Cecilia Jinesta por su aporte en el trabajo fotográfico.

LITERATURA CITADA

- ABO EL-NIL, M.M.; ZETTLER, F.W. 1976. Callus initiation and organ differentiation from shoot tip cultures of *Colocasia esculenta*. *Plant Science Letters* 6:401-408.
- ACHEAMPONG, E.; HENSHAW, G.G. 1983. *In vitro* methods for cocoyam improvement. In *Tropical root crops: Production and uses in Africa*. Proceedings of the Second Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops-Africa Branch. Ed. by E.R. Terry *et al.* Cameroon. p. 165-168.
- ALCONERO, R.; ZETTLER, F.W. 1971. Virus infection of *Colocasia* and *Xanthosoma* in Puerto Rico. *Plant Disease Reporter* 55(6):506-508.
- ARDITTI, J.; STRAUSS, M.S. 1979. Taro tissue culture manual. U.S.A. South Pacific Commission. 59 p. Manual no. 671.
- DEBROT, E.A.; ORDOSGOITTI, A. 1974. Dasheen mosaic virus infection of *Colocasia* and *Xanthosoma* in Venezuela. *Plant Disease Reporter* 58(11):1032-1034.
- GOMEZ, L.; MONGE, M.; VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. 1989. Micropropagación de tres aráceas comestibles libres de virus. *Turrialba* 39(2). En Prensa.
- 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.
- HICKS, G.S. 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *The Botanical Review* 46(1):1-23.
- HUNTER, W.M. 1978. Radioimmunoassay. In *Handbook of experimental immunology*. Great Britain, Alden Press. v. 1, p. 143.
- JACKSON, G.V.; BALL, E.A.; ARDITTI, J. 1977. Tissue culture of taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott. *Journal of the Horticultural Science* 52:373-382.
- MONGE, M.; ARIAS, O.; RAMIREZ, P. 1987. Obtención de plántulas de tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*), de tiquisque morado (*Xanthosoma violaceum*) y de ñampí (*Colocasia esculenta*) libres de virus por medio del cultivo *in vitro* de ápices. *Agronomía Costarricense* 11(1):71-79.
- MONGE, M.; GOMEZ, L.; VALVERDE, R.; ARIAS, O. 1987. Evaluación preliminar del comportamiento en el campo de plantas de ñampí (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*) provenientes del cultivo *in vitro* de ápices. *Agronomía Costarricense* 11(1):189-194.
- MONTALDO, A. 1983. Cultivo de raíces y tubérculos. San José, IICA. 284 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-487.
- NYMAN, L.P.; GONZALEZ, C.J.; ARDITTI, J. 1983. *In vitro* selection for salt tolerance of taro (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*, Araceae). *Annals of Botany* 51:229-236.
- LIU, L.J.; LICHA, M.; BELL, A.D.; ROSA, E. 1982. Variations in morphology and mosaic virus resistance in plantlets of taniér (*Xanthosoma* spp.) via tissue culture. *Phytopathology* 72:990 (Abstr.).
- ONWUEME, I.C. 1978. The tropical tuber crops: yams, cassava, sweet potato, cocoyam. New York, Wiley and Sons. 234 p.
- PIERIK, R.L.M. 1988. *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. *Acta Horticulturae* 226:25-40.
- SALAZAR, I. 1989. Informe sobre la estandarización de una técnica para la detección del virus del mosaico del dasheen. San José, Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas. 14 p. (mimeografiado)
- SALAZAR, I.; ROY, A.; GOMEZ, L.; ARIAS, O. 1991. Detección del virus del mosaico del dasheen en aráceas por la técnica del radioinmunoensayo. *Agronomía Costarricense* 15(1/2).
- STARITSKY, G. 1980. *In vitro* storage of aroid germoplasm. *Plant Genetics Resources Newsletter* 42:25-27.
- WANG, J.K. 1983. Taro: A review of *Colocasia esculenta* and its potential. Honolulu, University of Hawaii Press. 400 p.
- ZETTLER, F.W.; HARTMAN, R.D. 1987. Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. *Plant Disease* 71(11):958-963.