

## REGENERACION DE TIQUISQUE BLANCO (*Xanthosoma sagittifolium*) POR EMBRIOGENESIS SOMATICA<sup>1/\*</sup>

Luis Gómez \*\*  
Roberto Valverde \*\*  
Oscar Arias \*\*  
Trevor Thorpe \*\*\*

### ABSTRACT

Regeneration of *Xanthosoma sagittifolium* through somatic embryogenesis. Meristem explants of cocoyam gave rise, to fast-growing calli on Murashige and Skoog medium, supplemented with IAA and kinetin, after 8 weeks in culture. After 12 to 16 weeks, the calli were transferred to a medium devoid of growth regulators. At this moment, calli appearance changed and embryo-like structures appeared. Histological studies performed with the paraffin embedding procedure, showed that plant regeneration occurred via somatic embryogenesis. Additionally, calli have been maintained in the same medium and have increased their mass and number of somatic embryos.

### INTRODUCCION

El tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.), familia Araceae posee un gran potencial de producción en el trópico bajo húmedo, alrededor del mundo.

La propagación asexual, mediante la técnica de cultivo de tejidos permite obtener plantas madre libres de virus y otros patógenos, mantenerlas e incrementarlas con relativa facilidad.

La propagación *in vitro* de las aráceas comestibles (*Colocasia* y *Xanthosoma*) se realiza actualmente, mediante organogénesis y la proliferación de brotes axilares, lo que representa una alta demanda de mano de obra, que encarece los costos de producción y limita la aplicación

comercial de esta técnica, debido al bajo costo de estas plantas en comparación con las aráceas ornamentales.

La utilización de sistemas sujetos a la automatización, como la embriogénesis somática y el cultivo de células y protoplastos, se han sugerido como alternativas para masificar la producción y reducir los costos.

La embriogénesis somática es el proceso por el cual, células haploides o diploides se desarrollan y diferencian en plantas, a través de los estados embriológicos característicos, pero sin la fusión de gametos. La obtención de plantas y no de órganos aislados, es lo que hace a este proceso muy ágil y deseable entre los métodos de propagación vegetativa.

No existen informes sobre la ocurrencia de embriogénesis somática en aráceas comestibles. Gupta (1985), señaló que algunos de los callos de tiquisque obtenidos en su trabajo, poseían apariencia embriogénica. En cuanto al uso de protoplastos, Liu *et al.* (1988) lograron aislar protoplastos de *Xanthosoma* spp.; no obstante, se desconoce lo referente a resultados posteriores.

El presente trabajo muestra evidencia de la aparición de embriogénesis somática en tiquisque blanco.

1/ Recibido para publicación el 28 de octubre de 1991.

\* Esta investigación se llevó a cabo con la ayuda de una subvención otorgada por el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID), Ottawa, Canadá.

\*\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

\*\*\* Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, The University of Calgary. Alberta, Canadá.

## MATERIALES Y METODOS

Se cultivaron ápices caulinares de tiquisque blanco, con 2 ó 3 primordios foliares, en un medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 25 mg/L de ácido indolacético (AIA) y 2 mg/L de kinetina (Kin). Este medio fue previamente establecido para la obtención de plántulas por organogénesis directa (Monge *et al.*, 1987). Las condiciones de cultivo fueron:  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y una intensidad lumínica entre 30 y  $40 \mu\text{Em}^2/\text{s}$  con un fotoperíodo de 12 h. Se utilizaron tubos de ensayo de 18 x 150 mm. En estas condiciones algunos de los ápices formaron callo después de 8 semanas de incubación. Entre las 12 y 16 semanas los callos se transfirieron a un medio MS sin reguladores de crecimiento, donde continuaron su desarrollo y se diferenciaron a plántulas.

Para el estudio histológico, se fijaron callos en diferentes etapas de desarrollo en una mezcla de formaldehído (2%) y gluteraldehído (2%), preparada en una solución 0,05 M de amortiguador de fosfatos, pH 6,8. Los tejidos se fijaron durante 48 h y luego se procedió a la deshidratación en metilcelosolve por 24 h, seguido por 2 cambios de 24 h cada uno, en alcohol absoluto. Posteriormente, se inició la serie de deshidratación con alcohol butílico terciario (TBA), para finalizar en el TBA absoluto. Los tejidos se infiltraron en Paraplast Plus. Se seccionó los tejidos con un micrótopo rotatorio y el grosor de los cortes fue de 7 micras. Para la tinción se utilizó safranina y verde rápido, de acuerdo con la metodología descrita por Yeung (1984).

## RESULTADOS

Los callos obtenidos mostraron un rápido crecimiento y la división celular espontánea de estos permitió su multiplicación. Con la transferencia de los callos a un medio sin reguladores de crecimiento, se promovió su diferenciación a plántulas y se obtuvo un elevado número de plántulas por callo. Durante el proceso de desarrollo de los callos se observó la formación de estructuras nodulares; algunos de los callos tomaron forma de agregados y apariencia embriogénica (Figura 1). Las estructuras nodulares se separaron fácilmente y mostraron parte aérea y radical; se observó coincidencia entre el brote y la raíz. La Figura 2 muestra la secuencia de formación de plántulas a partir de las estructuras nodulares.

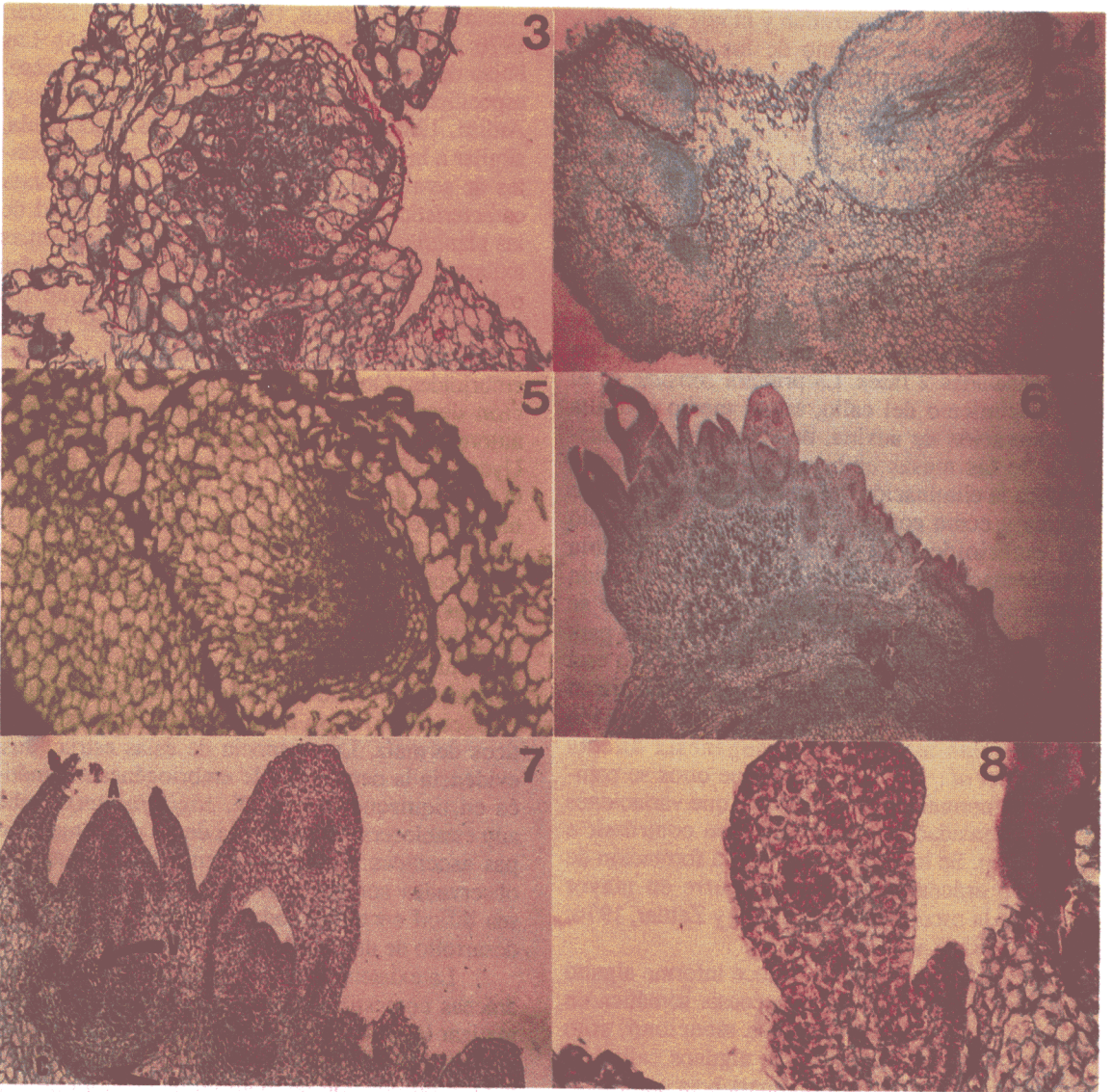


Fig. 1. Callos de apariencia embriogénica.  
Fig. 2. Secuencia de desarrollo de embrioides.

El seccionamiento de los callos permitió observar centros meristemáticos (meristemoides), caracterizados por células pequeñas, de citoplasma denso, paredes delgadas y núcleos grandes. Estas zonas dan origen a las estructuras nodulares observadas en la superficie de los callos (Figura 3).

El estudio de los agregados, que se desprendían fácilmente, mostró que cada estructura globular está delimitada dentro de la masa de callo (Figura 3). En algunos agregados es obvia la polarización y la concentración de actividad meristemática, que eventualmente da origen al vástago y a la radícula. También se observa actividad procambial y posterior formación de tejido vascular (Figura 4). Como las estructuras están ubicadas en diferentes posiciones, es difícil obtener una sección longitudinal de ellas. La Figura 4 muestra la zona radicular en un corte tangencial del embriode. La Figura 5 corresponde a un acercamiento de la misma zona.

En secciones de callo más compacto se identificó la formación de brotes en la superficie del callo. Inicialmente, se señalaron como de origen organogénico, pero observaciones al microscopio permitieron establecer que a cada brote le



- Fig. 3. Meristemoides presentes en diferentes zonas de los callos (250 X).  
 Fig. 4. Orientación de las estructuras nodulares, en un corte del callo embriogénico (32 X).  
 Fig. 5. Acercamiento del área de la raíz de una de las estructuras nodulares (250 X).  
 Fig. 6. Formación de embrioides en la superficie del callo (32 X).  
 Fig. 7. Estructura típica de los embrioides, A (sección apical), R (polo radical), V (haces vasculares), C (callo) (250 X).  
 Fig. 8. Separación espontánea de los embrioides formados a partir del callo (250 X).

correspondía un polo radical bien definido y coincidente con él (Figura 6). Esta es la estructura típica de un embriode: se aprecian claramente los polos apical (A), con varios primordios foliares y el radical (R); en adición, se puede observar la presencia de haces vasculares (V) en la zona media.

A los lados se notan secciones de callo (C) con células en un arreglo laxo y con altos contenidos de lípidos y de almidón, indicativos de una alta actividad meristemática (Figura 7).

En callos compactos también se observa que los embriones se mantienen inmersos en el

callo, los brotes se desarrollan y la raíz se mantiene reprimida. Este es uno de los factores que genera mayor confusión, pues en apariencia los brotes son de origen organogénico, cuando en realidad se produjeron vía embriogénesis somática, tal y como se demuestra en la Figura 8 cuando el embriode se libera totalmente.

## DISCUSION

En el proceso de obtención de plántulas mediante embriogénesis somática indirecta, han sido señaladas 2 fases. La primera consiste en el establecimiento del callo, en un medio con alta concentración de auxina, donde ocurre la inducción de las masas embriogénicas. La segunda implica la eliminación del suplemento exógeno de auxina y como consecuencia ocurre el desarrollo del embriode y la formación de la plántula (Kohlenbach, 1985). En la presente investigación ambas fases estuvieron presentes, por lo que se estima existieron las condiciones adecuadas para la obtención de los resultados expuestos. No está clara la razón por la que algunos ápices formaron callo en un medio establecido para la obtención de plántulas mediante organogénesis directa (Monge *et al.*, 1987), mientras que otros se comportaron normalmente. Es posible que variaciones en la intensidad lumínica pudieron contribuir a este hecho. Se ha establecido que la formación de callo en aráceas comestibles ocurre en mayor grado en la oscuridad (Abo-El Nil y Zettler, 1976; Gupta, 1985; Liu *et al.*, 1988).

Hasta la fecha no se conoce informe alguno sobre la aparición de embriogénesis somática en aráceas comestibles. Como se mencionó, solo Gupta (1985) ha sugerido que algunos callos de *Xanthosoma* spp. mostraron apariencia embriogénica. Sin embargo, la mayoría de los trabajos se han conducido con fines de multiplicación y de obtención de plantas libres de virus, con énfasis en las tasas de multiplicación y en el tiempo requerido para producir las plántulas. Es posible señalar algunos aspectos derivados de dichos trabajos que apoyan la posibilidad de que en ellos se haya presentado embriogénesis somática. Comúnmente en el proceso de regeneración de plántulas, una fase previa de callo está presente y para ésta se emplea un medio con un contenido bastante alto de auxina. Asimismo, la diferenciación de los embrioides y plántulas tiene lugar al transferir los callos a un medio sin reguladores de

crecimiento (Hartman, 1974; Abo-El Nil y Zettler, 1976; Strauss y Arditti, 1980; Gupta, 1985). Las hojas de las plántulas derivadas de este proceso, específicamente en *Xanthosoma caracu* (Struss y Arditti, 1980) poseen una apariencia redondeada, similar a la que presentan las plántulas provenientes de semilla sexual. En algunas ocasiones, esta característica se ha tomado como juvenilidad de las plántulas producto del desarrollo de las yemas axilares, sin asociarse al posible hecho de que las plántulas procedan de embrioides aunque los autores también han observado ese tipo de formación foliar en plántulas provenientes de posibles embrioides. Otro aspecto a destacar, es la aparición de estructuras denominadas por algunos autores como "protocormos" (Thi Quynh y Van Uyen, 1987; Abo-El Nil y Zettler, 1976) durante el proceso de obtención y multiplicación de plántulas, las cuales no han sido descritas a nivel histológico. Estas estructuras dan origen a plántulas completas lo que indica la existencia de polaridad en ellas.

La Figura 7 muestra en forma completa la estructura típica de un embrión, cuya formación concuerda con lo observado por Mc Kain y Hodges (1986) en su trabajo con embriones somáticos de maíz. La presencia de estas estructuras, evidencia la ocurrencia de embriogénesis somática en tiquisque blanco (*X. sagittifolium*). Debe aún establecerse la secuencia de las diferentes etapas asociadas a este fenómeno. Las estructuras observadas son de gran tamaño y posiblemente sea difícil encontrar todas las etapas clásicas del desarrollo de un embriode.

La existencia de embriogénesis somática en aráceas comestibles abre la posibilidad de automatizar la producción *in vitro* de plantas libres de virus e incrementar los genotipos promisorios para la producción de material de siembra de alta calidad a bajo costo, lo que contribuiría a aumentar el rendimiento y la calidad de la cosecha en estos cultivos.

## RESUMEN

El cultivo *in vitro* de meristemas de tiquisque blanco llevó a la formación de un callo de rápido crecimiento, obtenido a las 8 semanas de cultivo, en un medio de Murashige y Skoog (1962) suplementado con ácido indol acético (AIA) y kinetina. Entre las 12 y las 16 semanas los callos se transfirieron a un medio desprovisto

de reguladores de crecimiento, donde se formaron los embrioides, cuya identificación se realizó mediante estudios histológicos, los que confirman un proceso de embriogénesis somática. Esta vía de propagación se puede mantener e incrementar en el mismo medio de cultivo.

### AGRADECIMIENTO

Los autores expresan a la Dra. Eugenia Flores su agradecimiento por la revisión del presente trabajo y sus valiosas sugerencias.

### LITERATURA CITADA

- ABO-EL NIL, M.M.; ZETTLER, W. 1976. Natural occurrence of dasheen mosaic virus in Egyptian taro (*Colocasia antiquorum*). *Plant Disease Reporter* 60:281-285.
- GUPTA, P.P. 1985. Plant regeneration and variabilities from the tissue culture of cocoyams (*Xanthosoma sagittifolium* and *X. violaceum*). *Plant Cell Reports* 4:88-91.
- 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.
- KOHLLENBACH, H.W. 1985. Fundamental and applied aspects of *in vitro* plant regeneration by somatic embryogenesis. In *in vitro* techniques propagation and long term storage. Ed. by A. Shaefer. p. 101-109.
- LIU, L.J.; ROSA-MARQUEZ, E.; LICHA, M.; BIASCOE-CHEA, M.L. 1988. Tanier (*Xanthosoma spp.*) propagation *in vitro*. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 72(3):413-426.
- MCCAIN, J.W.; HODGES, T.K. 1986. Anatomy of somatic embryo cultures. *Botanical Gazette* 147(4):453-460.
- MONGE, M.; ARIAS, O.; RAMIREZ, P. 1987. Obtención de plantas de tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*), de tiquisque morado (*X. violaceum*) y de ñampí (*Colocasia esculenta*), libres de virus por medio del cultivo *in vitro* de ápices. *Agronomía Costarricense* 11(1):71-79.
- STRAUSS, M.S.; ARDITTI, J. 1980. Plantlet regeneration from shoot tip culture of *Xanthosoma caracu*. *Annals of Botany* 45(2):209-212.
- THI QUYNH, N.; VAN UYEN, N. 1987. Aroids propagation by tissue culture: I. Shoot tip culture and propagation of *Xanthosoma violaceum*. *HortScience* 22(4):671-672.
- YEUNG, E. 1984. Histological and histochemical staining procedures. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. v1. Laboratory Procedures and their Applications. Ed. I. Vasil. New York, USA, Academic Press. p. 689-697.