

Capítulo 20

Micropropagación de aráceas comestibles

S. Salazar S.*

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el convenio CATIE/GTZ (Agencia Alemana de Cooperación Técnica). Mi más sincero agradecimiento a Adriana Durán y a Xinia Durán por su apoyo en la elaboración de este manuscrito y por su colaboración en la mecanografía del texto.

* Department of Plant Biology, University of Birmingham, Inglaterra.

Introducción

La micropropagación por cultivo de tejidos se ha convertido en una herramienta de gran ayuda para la producción rápida de plantas de interés económico para el hombre, así como para limpiar de patógenos, especialmente de tipo viroide, los tejidos vegetales (Salazar, 1985a; 1985b). Por ello, esta técnica ha favorecido el intercambio internacional de germoplasma, al cual se han impuesto restricciones en los países receptores para evitar la diseminación de plagas y enfermedades en las regiones agrícolas. Además, el almacenamiento en condiciones de crecimiento limitado y la criopreservación de tejidos vegetales han comenzado a tomar auge porque evitan la pérdida causada por los patógenos y las plagas de aquellas especies vegetales que, hasta el momento, se han propagado vegetativamente.

Las aráceas comestibles se cuentan entre esas especies; cultivadas por sus cormos almidonosos, las hojas jóvenes y los pecíolos de algunas de ellas se comen en ensaladas (Pluckneet, 1976). Las raíces comestibles del tiquisque blanco y morado [*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, *X. violaceum* Schott, *X. brasiliense* Engl.], de la malanga o taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* y *C. esculenta* var. *antiquorum*) y del ñame elefante (*Amorphophallus rivieri* Durieu) son importantes fuentes de carbohidratos en regiones tropicales y subtropicales. En general, las aráceas citadas se propagan vegetativamente plantando secciones del cormo en que se encuentren yemas apicales. Este método de propagación no es efectivo para mantener genotipos libres de enfermedades; por ello, la diseminación de éstas ha sido considerable.

Por otra parte, el mantenimiento de las colecciones de campo es costosa y los ataques de patógenos, especialmente de viroides, resultan en la pérdida de genotipos. Así, por ejemplo, el Dasheen Mosaic Virus (DMV) detectado en la colección de campo de las aráceas comestibles del CATIE (Ramírez, 1983) ha sido el responsable de la pérdida de más del 50% de los cultivares de *Xanthosoma* y *Colocasia* (Salazar, 1985a).

Plantas de aráceas limpias de virus pueden obtenerse propagándolas por semilla (Hartman, 1974; Volin et al., 1976), mediante el cultivo de ápices (Abo El-Nil et al., 1976; Arditti et al., 1979; Hartman, 1974), o por el cultivo in vitro de meristemas como ocurre con *X. brasiliense* Engl. (Staritsky, 1974). Mediante la termoterapia y el cultivo de meristemas se han obtenido plantas de *X. sagittifolium* (L.) Schott y de *X. violaceum* Schott que no presentan síntomas de DMV aun en su fase madura de crecimiento (Figura 20.1). En estas plantas el DMV tampoco ha sido detectado por ensayos serológicos (Salazar et al., 1985; Salazar, 1985b).

Tiempo (semanas)	4	8	12	16	20	24	28
Etapas de la micropropagación de tejidos vegetales	Tratamiento de termoterapia	Cultivo de meristemas (medio A)	Desarrollo de yemas axilares (medio B)	Regeneración de plantas completas (medio C)	Crecimiento, desarrollo (invernadero)		Campo

Figura 20.1. Cronograma aproximado para el cultivo de meristemas, la micropropagación in vitro, el desarrollo de plantas completas, y el establecimiento en el suelo de 24 genotipos de *Xanthosoma* spp.

En este capítulo se describe una metodología sencilla para la micropropagación de aráceas comestibles mediante el cultivo de tejidos; fue desarrollada en este laboratorio con *X. sagittifolium* (L.) Schott, *X. violaceum* Schott y *C. esculenta*. Además, se añade una breve revisión de la literatura sobre procedimientos para la propagación in vitro de otras aráceas comestibles.

Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott y *X. violaceum* Schott

Desinfección del material de campo

Los cormos de tiquisque blanco y morado se despojan de las partes dañadas por insectos, hongos o bacterias. Luego se cortan en trozos de aproximadamente 250 g cada uno y se sumergen en una solución fungicida (benomil 0.1%) durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se dejan secar durante 45 minutos sobre un papel absorbente.

Termoterapia

En potes de 85 x 12 mm se coloca tierra previamente esterilizada con bromuro de metilo. Los cormos se siembran en los potes y se colocan en una cámara de termoterapia donde reciben una corriente de aire caliente de 38 a 39 °C durante el día y la noche. La intensidad lumínica debe ser de 3.5 klux al nivel de los cormos, y el fotoperíodo de 16 h, suministrado éste por lámparas fluorescentes de luz blanca. El riego debe ser diario y la humedad relativa debe oscilar entre el 60% y el 80%. Después de 5 ó 6 semanas de termoterapia, uno o dos pecíolos alcanzan unos 20 cm de longitud; en este momento se hace la disección de los ápices.

Desinfección de los ápices

Los cormos con uno o dos pecíolos de 20 cm de longitud se decapitan en la región donde se encuentra el ápice. Esta operación provocará la emisión de más yemas que, al cabo de 5 ó 6 semanas, serán la fuente de nuevo material.

Los ápices mencionados se cortan con un cuchillo pequeño, eliminando el exceso de follaje y de tejido subapical hasta que tengan aproximadamente 1 cm de longitud por 1 cm de ancho. En seguida se desinfectan en

una solución de hipoclorito de calcio comercial al 10% (v/v) a la que se agregan 2 gotas del humectante Tween-80 por cada 100 ml de solución. Los ápices se sumergen en esta solución y se mantienen en agitación constante durante 10 ó 15 minutos.

Disección de los meristemas

En una cámara de flujo laminar, los ápices se lavan tres veces con agua destilada estéril. Con la ayuda de un estereoscopio y con pinzas de punta fina, se elimina el exceso de hojas inmaduras. Se hacen cortes alrededor del ápice, de afuera hacia adentro, en la zona que separa el tejido subapical y las hojas. Se repite esta operación hasta que se observe el meristema con 2 ó 4 primordios foliares. En estos ensayos se ha empleado MS como medio de cultivo básico (Cuadro 20.1) con algunas modificaciones. Haciendo uso de la microcuchilla, se eliminan los primordios foliares, se extrae el meristema y se lo coloca en los tubos que contienen 10 ml del medio de iniciación (medio A, Cuadro 20.2). Este medio puede ser líquido, y entonces el meristema flotará, o puede ser semisólido. En ambos casos el meristema debe colocarse con la parte proximal en contacto con el medio. Los cultivos se incuban en una cámara de crecimiento con una temperatura de 28 y 26 °C, diurna y nocturna respectivamente. La intensidad lumínica es de 3 a 4 klux y la suministran lámparas fluorescentes de luz blanca. El fotoperíodo es de 14 horas. Después de 5 ó 6 semanas en el medio de iniciación, se observa un crecimiento alrededor y hacia arriba del meristema, que corresponde al desarrollo de las primeras hojas de color verde. En la zona subapical se observa el crecimiento de un tejido de color blanco y de textura similar al tejido que almacena almidón en los cormos maduros.

Desarrollo de yemas axilares

A los explantes provenientes del medio A se les hacen, en condiciones asépticas, varios cortes en cruz con un escalpelo en el tallo. Inmediatamente se transfieren a frascos de vidrio que contienen 20 ml del medio B o medio de desarrollo de yemas (Cuadro 20.2). Las condiciones de incubación son iguales a las descritas para los meristemas. Mediante los cortes transversales del tallo se decapita el meristema y se elimina la dominancia apical; esta operación provoca la emisión de un mayor número de yemas, favorecida aún más con la formulación del medio B (Cuadro 20.2). Por lo menos 60 yemas/tallo han sido contadas en este medio (Salazar et al., 1985). Después de 3 ó 4 semanas se puede realizar la misma operación cortando pequeños trozos en que se vean yemas y colocándolos en el medio B; así se estimulará la brotación de nuevas yemas.

Cuadro 20.1. Medios de cultivo en la micropropagación de aráceas comestibles.

Constituyentes	Concentración final (mg/litro)	
	MS ^a	AZ ^b
NH ₄ NO ₃	1650	
KNO ₃	1900	2350
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	369.75
KH ₂ PO ₄	170	
NH ₄ H ₂ PO ₄		345.00
H ₃ BO ₃	6.2	6.20
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	11.20
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	4.30
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025
KI	0.83	0.83
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	220.50
Na ₂ EDTA	37.3	37.35
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.85
m-Inositol	100	1000
Tiamina-HCl	0.4	5.0
Piridoxina-HCl		0.5
Niacina		5.0
Glicina		2.0
ANA	(0.2 - 2.0)	(2.0)
Cinetina (KIN)	(2.0)	0.007
Sacarosa	30,000.00	20,000.00
Agar	7,000.00	6,000.00
pH	5.7 ± 0.1	5.7 ± 0.1

a. Modificado de Murashige y Skoog, 1962.

b. Abo El-Nil y Zettler, 1976.

Desarrollo de plantas completas

Para el desarrollo de plantas completas se utilizan explantes provenientes del medio B que presenten yemas incipientes. Estos explantes se transfieren al medio C o medio de crecimiento y desarrollo (Cuadro 20.2). En este medio, después de 4 ó 5 semanas, se obtendrán plantas con muchas hojas de color verde intenso y un sistema radical bien desarrollado de color blanco (Figura 20.1).

Cuadro 20.2. Constituyentes de los medios para el cultivo de meristemas, el desarrollo de yemas axilares, y la regeneración de plantas completas de 24 genotipos de *Xanthosoma*.

Constituyentes del medio ^a	Concentración (mg/litro) del medio:		
	A, iniciación de meristemas ^b	B, desarrollo de yemas axilares ^c	C, regeneración de plantas completas ^c
Sales inorgánicas	MS	MS	MS
m-Inositol	100	100	100
Tiamina-HCl	0.1	0.1	0.1
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	0.5
Acido nicotínico	0.5	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0	2.0
Sacarosa	30,000	30,000	30,000
Agar	0.0	7,000	7,000
BAP	0.1	3.00	0.0

a. Todos los medios nutritivos se esterilizan en una autoclave a 15 psi (121 °C).

b. Tubos de 25 x 95 mm con tapa de rosca; un explante por tubo de cultivo. MS = Murashige y Skoog, 1962.

c. Frascos comerciales usados para envasar alimentos para niños (60 x 100 mm); las tapas son del tipo 'B-caps' (Magenta, Chicago, E.U.); 4-6 tallos por frasco de cultivo.

FUENTE: Salazar S. et al., 1985.

Cultivo de ápices

Los procedimientos para la desinfección de los cormelos, para la termoterapia y para la desinfección de los ápices son iguales a los descritos anteriormente. La disección de los ápices se hace en las mismas condiciones descritas para los meristemas. Una vez descartada la abundancia de hojas, queda visible la zona donde se localiza el meristema apical. Se debe procurar que el meristema esté rodeado por unos 4 ó 6 primordios foliares; en seguida se hace un corte trasversal a unos 3 mm por debajo de la zona subapical. El explante (1.8 mm de largo) se coloca en la punta de la microcuchilla y se trasfiere al medio de cultivo B (Cuadro 20.2). La incubación de los cultivos en la cámara de crecimiento ocurre con temperatura y fotoperíodo iguales a aquéllos aplicados a los meristemas, pero con 2 ó 2.5 klux de intensidad lumínica. Después de 4 ó 5 semanas se realiza el mismo procedimiento indicado para la inducción de yemas axilares y para el desarrollo de plantas completas, cuando se emplean meristemas.

Establecimiento de las plantas en el suelo

Las plantas con hojas y raíces bien desarrolladas se sacan de los frascos y se lavan con agua corriente para eliminar cualquier resto de agar. Luego se plantan en bolsas plásticas de 1 kg que contienen tierra ya esterilizada con bromuro de metilo. Para evitar la pérdida de humedad en las plantas, éstas son transferidas a una cámara de plástico donde se mantienen a una humedad relativa del 80% o más. En estas condiciones permanecen durante un período de 3 ó 5 días. Es recomendable que la cámara de plástico no se exponga a la luz directa del sol pues ésta ocasionaría altas temperaturas (45 °C o más) dentro de la cámara que matarían las plantas (Salazar et al., 1985). La cámara de plástico debe colocarse en un invernadero cubierto con malla fina en las paredes y con un techo trasparente (Salazar et al., 1985). En estas condiciones se logra un 100% de sobrevivencia de las plantas. Después de 3 ó 5 días la cámara de plástico se retira y las plantas se dejan en condiciones de invernadero durante 13 semanas, regándolas cada dos días.

El traslado de las plantas a la luz solar en campo abierto puede hacerse cuatro semanas después de haberse quitado la cámara de plástico. En este estado las plantas se dejan el tiempo necesario para que alcancen la uniformidad deseada en cuanto a tamaño y número de hojas antes de trasladarlas a las condiciones del campo. Desde el tratamiento de termoterapia hasta el establecimiento de las plantas en el invernadero transcurren aproximadamente 24 semanas.

Formación de callos y organogénesis

Los pasos que deben darse desde la desinfección de los cormelos hasta la disección de los meristemas son los mismos descritos anteriormente. Los pasos siguientes se llevan a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Gupta (1985). Los meristemas con 2 a 4 primordios foliares se colocan en el medio AZ (Cuadro 20.1) con 2 mg/litro de ANA. Después de seis semanas en la oscuridad a 26 °C, se observa la formación de callos. Para inducir la organogénesis, trozos de unos 2.5 mm³ de los callos son transferidos a un medio MS (Cuadro 20.1) que contenga 2 mg/litro de KIN y de 0.2 a 2 mg/litro de ANA. Los cultivos se incuban a 26±1 °C; la luz es suministrada por lámparas fluorescentes (cerca de 15 µE/m² por sg) con un fotoperíodo de 16 h. Después de 3 ó 4 semanas de incubación, los callos se tornan de textura dura y de color verde, con zonas oscuras y con protuberancias por toda su superficie; muchas de estas protuberancias producirán pequeñas agrupaciones de hojas y después presentarán tallos y raíces. Para la regeneración de plantas de *X. sagittifolium* se requiere una baja concentración de

ANA (0.2 mg/litro) y de KIN (2.0 mg/litro), en tanto que para las de *X. violaceum* la mejor respuesta se obtiene con 2.0 mg/litro de ANA y 2 mg/litro de KIN. En *X. violaceum*, además, se puede inducir la organogénesis en un solo paso: los meristemas con 2 ó 4 primordios foliares se colocan en un medio MS (Cuadro 20.1) que contenga 5.0 mg/litro de ANA, 100 ml/litro de AC y 2.0 mg/litro de KIN. El callo obtenido, de color verde, es de estructura compacta y nodular. La consiguiente formación de yemas, tallos y raíces hasta la formación de plantas bien desarrolladas tarda unas ocho semanas.

Colocasia esculenta

El procedimiento de cultivo de meristemas y ápices descrito para las dos especies de *Xanthosoma*, desde la desinfección de los cormos hasta el establecimiento de las plantas en el suelo, es aplicable a dos variedades de *Colocasia esculenta*: *C. esculenta* var. *esculenta* y *C. esculenta* var. *anti-quorum*. La inducción de yemas axilares ocurre de manera similar a la del género *Xanthosoma*.

Xanthosoma brasiliense Engl.

La desinfección del material de campo, la termoterapia, la desinfección de los ápices, y la disección de los meristemas se llevan a cabo según el procedimiento descrito para *X. sagittifolium* (L.) Schott y *X. violaceum* Schott.

Los meristemas o yemas se cultivan en un medio MS suplementado con los siguientes compuestos (en mg/litro): aneurina, 1.0; L-cisteína-HCl, 10; adenina, 1.0; meso-inositol, 100; CH, 100; Sacarosa, 30,000; y agar (Oxoid 1) 6000. Como reguladores del crecimiento se emplean AIB (1.0 mg/litro) y BA (5.0 mg/litro) (Staritsky, 1974).

El traslado de tallos individuales a medios frescos promueve el desarrollo de racimos de plantas, cuyo número varía con el tamaño del frasco de cultivo (Staritsky, 1974); por ejemplo, en tubos de 160 x 22 mm, un tallo de *X. brasiliense* produce un racimo con cerca de 30 plantas en dos meses (Staritsky, 1974). El desarrollo de plantas completas se logra en un medio MS semisólido sin reguladores del crecimiento o bien cuando aquéllas son trasplantadas al suelo (Staritsky, 1974). El procedimiento descrito aquí puede adaptarse al de *X. sagittifolium* (L.) Schott.

Xanthosoma caracu

Aunque no se ha informado acerca del empleo de la termoterapia en *X. caracu*, su similitud morfológica con *X. sagittifolium* (L.) Schott hace factible ese tratamiento con ella, el cual se aplicaría tal como se ha descrito para *X. sagittifolium*.

La desinfección de los explantes, así como la disección de los ápices con 4 ó 6 primordios foliares, se hace en condiciones similares a las empleadas con las otras aráceas.

El medio de cultivo para los ápices está constituido por las sales MS (Cuadro 20.1) y 100 mg/litro de ácido ascórbico; este medio es líquido, y se coloca en frascos Erlenmeyer de 250 ml. Los cultivos se colocan en un agitador orbital a 20 rpm. La intensidad lumínica es de 1.4 klux, el fotoperíodo es de 16 h, y la temperatura diurna y nocturna es de 22 ± 2 °C (Asokan et al., 1984b).

El alargamiento de los ápices se nota a los dos días de cultivo y de los 12 a los 15 días se observa el despliegue de la primera hoja. Después de 3 ó 4 semanas de cultivo el brote de 3 a 5 hojas se hace evidente. La rizogénesis comienza aproximadamente a las cinco semanas de incubación (Asokan et al., 1984b). Trascorridos de 7 a 10 días después de la aparición de las primeras raíces, todos los ápices se transfieren al medio de propagación rápida para promover la elongación de los tallos. Este medio está constituido por las sales MS (Cuadro 20.1), suplementado con los siguientes compuestos (en mg/litro): NaH_2PO_4 , 250; sulfato de adenina, 30; tiamina-HCl, 0.4; agar, 8000; y AIA, 0.5 (esterilizado por filtración). De este medio semisólido se colocan 100 ml en frascos Erlenmeyer de 250 ml (Asokan et al., 1984b). Los cultivos quedan expuestos a un fotoperíodo de 16 h, a una intensidad lumínica de 1.4 klux, y a una temperatura de 24 °C día y noche. Al cabo de 4 semanas se observa el brote de las yemas y es posible contar entre 45 y 70 plantas por frasco (Asokan et al., 1984b). La transferencia de las plantas a tierra estéril puede hacerse bajo las mismas condiciones mencionadas para las otras aráceas.

Amorphophallus rivieri Durieu

Los cormos se desinfectan en una solución de 1.05% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos. Se remueve la epidermis del corno junto con 2 cm de la corteza externa. El tejido restante se corta en cubos de 1 a 1.3 g; éstos se transfieren a tubos de cultivo de 15 x 24 cm que contienen 10 ml del

medio MS (Cuadro 20.1), con sus sales mayores diluidas a la mitad, con 200 mg/litro de NH_4NO_3 , y con 8 g/litro de agar. Los cultivos se mantienen en la oscuridad a 24 °C durante 5 semanas; luego se exponen a un fotoperíodo de 16 h con 6.4 W/m² de luz (Asokan et al., 1984a).

Los primeros signos de la diferenciación de tallos adventicios ocurren conjuntamente con protuberancias globulares de color blanco agrupadas en un callo compacto. Estas estructuras, similares a meristemoides, aparecen luego de 8 a 9 semanas de cultivo en presencia de 2.0 mg/litro de BA y de 0.1 a 0.3 mg/litro de ANA. Para acelerar la diferenciación de tallos, se practican varios cultivos en un medio MS (Cuadro 20.1) líquido con 3 mg/litro de ZEA, 0.01 mg/litro de AG, y 0.3 mg/litro de ANA; con este medio no sólo se logra incrementar el número de tallos sino también su longitud. El enraizamiento de estos tallos se consigue 10 días después de transferidos a un medio MS (Cuadro 20.1) que contenga 1.0 mg/litro de ANA. En condiciones de invernadero, se logra que el 100% de las plantas obtenidas se establezcan en tierra (Asokan et al., 1984a).

Referencias

- Abo El-Nil, M. M. y Zettler, F. W. 1976. Callus initiation and organ differentiation from shoot tip cultures of *Colocasia esculenta*. Plant Sci. Lett. 6:401-408.
- Arditti, J. y Strauss, M. S. 1979. Taro tissue culture manual. Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, California, E.U. 59 p.
- Asokan, M. P.; O'Hair, S. K. y Litz, R. E. 1984a. *In vitro* plant regeneration from corm callus of *Amorphophallus rivieri* Durieu. Scientia Hort. 24:251-256.
- ; ——— y ———. 1984b. Rapid multiplication of *Xanthosoma caracu* by *in vitro* shoot tip culture. HortScience 19(6):884-885.
- Gupta, P. P. 1985. Plant regeneration and variabilities from tissue cultures of cocoyams (*Xanthosoma sagittifolium* and *X. violaceum*). Plant Cell Rep. 4:88-91.
- Hartman, R. D. 1974. Dasheen mosaic virus eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips. Phytopathol. 64:237-240.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Pluckneet, D. L. 1976. Edible aroids. En: Simmons, N. W. (ed.). Evolution of crop plants. Longman Group, Londres. p. 10-12.

- Ramírez, P. 1983. Aroids virus research in Costa Rica. Center for Tropical Agriculture International Programs, IFAS, University of Florida in Hawaii, E.U. p. 22-23.
- Salazar, S. 1985a. Cultivo de meristemas en cormos, raíces y tubérculos tropicales. En: Sistemas de producción basados en raíces y tubérculos tropicales. Taller regional, marzo 1985. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
- . 1985b. Tissue culture at the Plant Genetic Resources Unit at CATIE. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
- ; Fernández, R. y Jarret, R. L. 1985. Virus-free plants obtained by thermotherapy and meristem culture of white (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) and purple (*X. violaceum* Schott) cocoyams. En: Seventh Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Guadalupe, 1985.
- Staritsky, G. 1974. *Xanthosoma brasiliense* Engl. propagated virus-free *in vitro*. Trop. Root Tuber Crops Newsl. 7:38-39.
- . 1977. *In vitro* storage of aroids germplasm. Plant Genet. Res. Newsl. 42:25-27.
- Volin, R. B. y Zettler, F. W. 1976. Seed propagation of cocoyam, *Xanthosoma caracu* Koch and Bouché. HortScience 11:459-460.