
Propagación clonal, conservación y transferencia internacional de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) *in vitro*, nativas del Perú.

M. M. Flores-Meza†, C. Rojas-Idrogo y G. E. Delgado-Paredes*

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Ciudad Universitaria, Juan XXIII No 391, Lambayeque-PERÚ.

†In memoriam.

In vitro clonal propagation, conservation and international transference of germplasm of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) native of Peru.

Abstract

Accessions of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) collected in Peru and preserved in the Germplasm Bank of Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque, Peru, were evaluated in both meristem and germplasm conservation culture medium. These culture media, conventionally called 4E and 8S, respectively, were formulated at the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) Cali, Colombia and are widely used in the eradication of systemic pathogens, conservation and international transference cassava germoplasm. In this work a descriptor of growth and development evaluation of cassava accessions was proposed, indicating that 80 and 95% of the meristems evaluated in the culture medium 4E and plantlets in the culture medium 8S, respectively, achieved normal to vigorous growth. In the international germplasm transference 278 accesions were transferred from UNPRG to CIAT and 249 accesions from CIAT to UNPRG.

Key words: Accessions, descriptor, growth limitation, meristems, plant growth regulators.

Resumen

Accesiones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) colectadas en el Perú y conservadas en el Banco de Germoplasma de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque, Perú, fueron evaluadas en medio de cultivo de iniciación de meristemas y de conservación de germoplasma. Estos medios de cultivo, denominados convencionalmente 4E y 8S, respectivamente, fueron formulados en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, y son de uso amplio en la erradicación de patógenos sistémicos, conservación y transferencia internacional de germoplasma. En este trabajo se propone un descriptor de evaluación de crecimiento y desarrollo de accesiones de yuca *in vitro*, indicando que 80 y 95% de los meristemas evaluados en el medio de cultivo 4E y plántulas en el medio de cultivo 8S, respectivamente, alcanzaron un crecimiento normal a vigoroso. En la transferencia internacional de germoplasma 278 accesiones fueron transferidas de la UNPRG al CIAT y 249 accesiones del CIAT a la UNPRG.

Palabras clave: Accesiones, descriptor, limitación del crecimiento, meristemas, reguladores de crecimiento.

*Autores de correspondencia
Email: guidelg2001@yahoo.es

Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) pertenece a la familia Euphorbiaceae, orden Euphorbiales. Este orden comprende 4 familias, ampliamente dominado por la Euphorbiaceae con alrededor de 8000 especies mientras que las otras familias presentan un menor número de especies (Cronquist, 1988). En el sistema propuesto por Angiosperm Phylogeny Group (APG) la familia Euphorbiaceae ha sido ubicada en el orden Malpighiales junto con numerosas familias pero con escasos representantes, Eurosids I (APG III, 2009).

La yuca es una especie americana tropical muy eficiente en la producción de carbohidratos, resistencia a sequía y capaz de producir en suelos marginales. Es una importante fuente de calorías para amplios sectores de la población mundial, en especial en África, Asia y América del Sur, destacando Nigeria, Tailandia y Brasil, respectivamente, y en la alimentación de animales; sin embargo, la productividad del cultivo es seriamente afectada cuando se utiliza reiteradamente el mismo material de siembra o se encuentra infectado por plagas y enfermedades sistémicas producidas por hongos, bacterias y virus. Su reproducción alogama y su constitución genética altamente heterocigótica constituyen la principal razón para propagarla por estacas y no por semilla sexual (Ceballos y De la Cruz, 2002). Adicionalmente, el material genético de yuca y especies relacionadas del género *Manihot*, que suman alrededor de 6000 accesiones y 100 especies, respectivamente (Escobar et al., 1997), se encuentra muy disperso y expuesto a pérdidas por destrucción de su hábitat natural y a la erosión genética, razones por la cual debe conservarse en bancos de germoplasma en campo y/o *in vitro* (Pounti-Kaerlas, 1998).

En efecto, una alternativa en la propagación y conservación de germoplasma de yuca es la utilización de diversas técnicas desarrolladas por el cultivo de tejidos. La organogénesis y la embriogénesis somática en yuca fueron reportadas a partir de callos de entrenudos (Tilquin, 1979) y protoplastos de mesófilo (Shahin y Shepard, 1980); sin embargo, estos protocolos no fueron reproducibles cuando se ensayaron en numerosos genotipos. Sobre cultivo de meristemas, una forma de propagación que posibilita la obtención de plantas libres de patógenos sistémicos, los primeros

trabajos fueron realizados por Kartha et al. (1974) quien observó crecimiento del meristema en cinco variedades de yuca en medio de cultivo suplementado con BA 0.1 mg l⁻¹, AG₃ 0.04 mg l⁻¹ y ANA 0.2 mg l⁻¹ y por Roca (1980), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia, formulando el medio de cultivo llamado convencionalmente 4E. Cultivo de meristemas combinado con tratamientos de termoterapia de estacas y termoterapia *in vitro* posibilitaron la erradicación de numerosas bacterias y virus (Kaiser y Teemba, 1979; Adejare y Coutts, 1981; Frison, 1994; Wassma et al., 2010) lo que mejoró sustancialmente la producción de yuca en campo (Delgado y Rojas, 1993). En otros trabajos se desarrollaron métodos de propagación masiva a partir de ápices caulinares y segmentos nodales (Konan et al., 1994; Konan et al., 1997) utilizando concentraciones de BA entre 0.5 a 10 mg l⁻¹ o en combinación con bajas concentraciones de auxinas, alcanzándose cifras teóricas de miles de unidades de siembra por año (Smith et al., 1986; Guo y Liu, 1995). Adicionalmente, varios autores han informado sobre nuevas mejoras en el proceso de micropropagación de la yuca utilizando fundamentalmente bajas concentraciones de BAP y ANA (Ogero et al., 2012; Abd Alla et al., 2013; Mopayi et al., 2013).

Por otro lado, los cultivos *in vitro* pueden conservarse modificando la composición química del medio de cultivo y/o ajustando las condiciones ambientales de incubación (Engelmann, 2011; Cruz-Cruz et al., 2013), existiendo en el caso de la yuca diversos trabajos. Ápices caulinares fueron conservados con baja iluminación en medio de cultivo MS suplementado con ANA 0.01 mg l⁻¹, BAP 0.02 mg l⁻¹ y AG₃ 0.1 mg l⁻¹, denominado convencionalmente 8S (Roca et al., 1989) y estos materiales genéticos han sido utilizados desde 1980 en la transferencia de germoplasma hacia diferentes lugares del mundo (Thro et al., 1998; Mafla et al., 2007). En la década del 80 el intercambio de materiales genéticos de yuca con la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG) Lambayeque, Perú, fue particularmente intenso, habiéndose transferido centenares de accesiones.

En este artículo se reporta el cultivo de meristemas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), realizado en el laboratorio de la UNPRG, Lambayeque, en el medio de cultivo 4E y la conservación de germoplasma en el medio de cultivo 8S, ambos utilizados por el

CIAT, proponiendo un modelo de evaluación en el crecimiento y desarrollo de centenares de accesiones de yuca peruanas. Asimismo, se informa sobre el proceso de intercambio internacional de germoplasma entre ambas instituciones.

Materiales y métodos

Procedencia y desinfección del material vegetal

El material vegetal estuvo conformado por 527 accesiones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). De este material genético 278 accesiones procedieron del Banco de Germoplasma de Yuca de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque, del Centro de Investigación y Promoción Agraria de Tarapoto-Estación Juan Guerra, Tarapoto (San Martín) y de la Colección de Yuca de J. Salick, cuya colecta se realizó en el valle de los ríos Pichis y Palcazu (Pasco) y 249 accesiones fueron introducidas del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, en forma de cultivos *in vitro*.

En el caso de las 278 accesiones de yuca peruanas, que incluyó tres accesiones de países sudamericanos, tres a cinco estacas de 15 a 20 cm, con 2 a 5 nudos, en las mejores condiciones fisiológicas y fitosanitarias, se desinfectaron en una solución de Orthocide 80 2.0 g l⁻¹ durante 5 min y luego se dejaron secar por 2 horas bajo sombra. Posteriormente, se selló el ápice de la estaca con parafina líquida para evitar deshidratación o putrefacción. Una vez secas las estacas se sembraron en potes conteniendo sustrato esterilizado (suelo-arena, 1:2) con bromuro de metilo durante 24 horas. El riego inicial fue con Plant Product, fertilizante NPK (N 10%, P₂O₅ 52% y K₂O 10%), y en los días subsiguientes con agua corriente. El cultivo se mantuvo en condiciones de invernadero.

Aislamiento de yemas y cultivo de meristemas

Después de 3 semanas de la siembra de estacas, 10 yemas por variedad, las de mayor elongación y vigorosidad, fueron aisladas utilizando una hoja de bisturí desinfectada cada vez que se cortaban yemas de una planta a otra. Estas yemas, de 1 a 2 cm de altura fueron desinfectadas en cámara de flujo laminar con etanol 70% durante 60 segundos y luego con hipoclorito de sodio comercial 0.5% durante 3 min (5.25% de cloro activo), removiéndose los desinfectantes con 3 enjuagues

con agua destilada esterilizada. Luego se procedió al aislamiento del meristema de 0.3 a 0.5 mm con 2 a 4 primordios foliares, el que fue cultivado en el medio de cultivo denominado convencionalmente 4E.

Elongación y enraizamiento del brote

Después de 30 días de cultivo en el medio de cultivo 4E, si el brote fue mayor de 15 mm se subcultivó, previa eliminación del callo basal, en el medio de cultivo de enraizamiento denominado convencionalmente 17N, pero si el brote fue menor de 15 mm se volvió a subcultivar en el medio de cultivo 4E, tantas veces como fue necesario. Después de 60 a 90 días plántulas de 5 a 8 cm de altura con 3 a 5 nudos fueron seccionadas en ápice caulinar y segmentos nodales y cada explante subcultivado en el medio de cultivo de conservación denominado convencionalmente 8S.

Formulación y preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo estuvo conformado por las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y las vitaminas tiamina.HCl 0.4 mg l⁻¹ y m-inositol 100.0 mg l⁻¹. El medio de cultivo 4E fue suplementado con ácido naftaleneacético (ANA) 0.02 mg l⁻¹, benzilaminopurina (BAP) 0.05 mg l⁻¹, ácido giberélico (AG₃) 0.05 mg l⁻¹, sacarosa 20.0 g l⁻¹ y agar 6 g l⁻¹; el medio de cultivo 17 N con ANA 0.01 mg l⁻¹, AG₃ 0.01 mg l⁻¹, sacarosa 20 g l⁻¹, Plant Product 25.0 mg l⁻¹ y agar 8.0 g l⁻¹ y el medio de cultivo 8S con ANA 0.01 mg l⁻¹, BAP 0.02 mg l⁻¹ y AG₃ 0.1 mg l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹ y agar 8 g l⁻¹. El pH de estos medios de cultivo se ajustó a 5.8±0.1 con KOH y HCl 0.1N, antes de incorporar el agar, y luego de dispensarse en tubos de ensayo de 125x15 (4E), 150x18 (17N) y 150x25 (8S) mm fueron esterilizados en autoclave a 125 °C de temperatura y 15 lb pulg⁻² de presión. Los medios de cultivo 4E, 17N y 8S fueron formulados por Roca (1980) y son de uso rutinario en la propagación y conservación de germoplasma de yuca en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia (Mafla et al., 2007).

Condiciones ambientales de incubación

Las condiciones ambientales de incubación se ajustaron a 28±2 °C, 20 μmol m⁻² s⁻¹ de iluminación, proporcionada por lámparas fluorescentes tipo luz de día, 16/8 horas de fotoperiodo y 70-80% de humedad relativa. En el caso de los cultivos en medio de cultivo 17N la

iluminación fue de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y para los cultivos en medio de cultivo 8S fue $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Criterios de evaluación

Una media de 10 meristemas por accesión fue evaluada en el medio de cultivo 4E y 15 plántulas en el medio de cultivo 8S. En 4E la evaluación se realizó a 30 días de establecido el cultivo y en 8S la evaluación se realizó a 1, 6, 9 y 12 meses de establecidos los cultivos. En la elección de los criterios de evaluación se adaptó parámetros seguidos en la mayoría de los descriptores de evaluación de los recursos fitogenéticos de varias especies preparados por el International Plant Genetic Resources Institute (ex-IBPGR/FAO), proponiéndose los siguientes indicadores:

A. Descriptor de caracteres morfológicos de evaluación

1. Evaluación porcentual del número de meristemas vivos: media de 10 meristemas por accesión

- 1 Muy bajo (0 a 20%)
- 2 Bajo (21 a 40%)
- 3 Intermedio (41 a 60%)
- 4 Alto (61 a 80%)
- 5 Muy alto (81 a 100%)

2 Evaluación de brotes por plántula

- 2.1 Número de brotes
 - 3 Normal (1 brote por plántula)
 - 4 Óptimo (>1 brote por plántula)

2.2 Tamaño del brote (mm)

- 1 Muy bajo (<5.4)
- 2 Bajo (5.5-10.4)
- 3 Intermedio (10.5-15.4)
- 4 Alto (15.4-20.4)
- 5 Muy alto (>20.4)

3 Evaluación de hojas por plántula

- 3.1 Número de hojas
 - 1 Muy bajo (1 hoja)
 - 2 Bajo (2 hojas)
 - 3 Intermedio (3 hojas)
 - 4 Alto (4 hojas)
 - 5 Muy alto (5 hojas)

3.2 Tamaño de hojas (mm)

- 1 Muy bajo (<5.4)
- 2 Bajo (5.5-10.4)
- 3 Intermedio (10.5-15.4)
- 4 Alto (15.5-20.4)
- 5 Muy alto (>20.4)

4 Evaluación de raíces por plántula

4.1 Presencia de raíces

- 3 Ausencia
- 4 Presencia

4.2 Número de raíces

- 3 Normal (1 a 2 raíces)
- 4 Óptimo (>2 raíces)

4.3 Tamaño de raíces

- 4 Normal (hasta 20 mm)
- 5 Óptimo (>20 mm)

5 Evaluación del número de meristemas (medio de cultivo 4E) y de nudos (medio de cultivo 8S) que regeneraron plántulas completas (brotes y raíces)

- 4 Normal (brotes sin raíces)
- 5 Óptimo (brotes con raíces)

B. Escala general de evaluación

- 1 Muy pobre (0.5 a 1.4)
- 2 Pobre (1.5 a 2.4)
- 3 Normal (2.5 a 3.4)
- 4 Vigoroso (3.5 a 4.4)
- 5 Muy vigoroso (>a 4.5)

Transferencia internacional de germoplasma

Una a tres plántulas por accesión se acondicionaron en cajas de tecnoport y con los respectivos certificados fitosanitarios de salida del Perú (SENASA, Ministerio de Agricultura) e ingreso a Colombia (ICA, Ministerio de Agricultura) y viceversa, fueron transportadas por vía aérea como equipaje personal.

Resultados y discusión

En la evaluación de accesiones de yuca en los medios de cultivo 4E y 8S se elaboró un descriptor de caracteres morfológicos de plántulas in vitro, tomando como referencia descriptores elaborados para la especie por Gulick *et al.* (1983) y Fukuda y Guevara (1998). Se evaluó el número de meristemas y plántulas que sobrevivieron y el número de brotes, hojas y raíces formadas. Esto permitió elaborar una escala general de evaluación, desde muy pobre (0.5 a 1.4) a muy vigoroso (> a 4.5). Estos resultados devienen de la sumatoria de los caracteres morfológicos dividido entre los nueve parámetros evaluados.

Evaluación en el medio de cultivo 4E

En las tablas 1 y 2 se muestran los resultados de la evaluación de 30 accesiones de yuca nativas del Perú en medio de cultivo de meristemas (4E). Todas las accesiones evaluadas crecieron en más de 80%

Tabla 1. Evaluación de accesiones de yuca en medio de cultivo de meristemas (4E) sobre viabilidad del meristema y número de brotes y hojas formadas, después de 30 días de establecidas *in vitro*.

| Escala general (Evaluación) | Viabilidad del meristema (Nº/%) | | | Brotes formados (Nº/%) | | | Hojas formadas (Nº/%) | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------------|-------|-------|------------------------|--------|--------|-----------------------|----------|-----------|-----------|-------|------|-------|------|------|-----|----------|-----------|-----------|-------|
| | 0-20 | 21-40 | 41-60 | 61-80 | 81-100 | Número | <5.4 | 5.5-10.4 | 10.5-15.4 | 15.5-20.4 | >20.4 | 1 | 2 | 3 | 4 | >5 | 5.5-10.4 | 10.5-15.4 | 15.5-20.4 | >20.4 |
| Grado 1 | | | | | | 9/30 | 9/30 | 6/20 | 9/30 | 4/13 | 2/7 | 5/20 | 11/43 | 7/17 | 5/17 | 2/3 | 7/23 | 13/43 | 9/30 | 1/4 |
| Grado 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Grado 3 | | 3/10 | | | | 30/100 | | | | | | | | | | | | | | |
| Grado 4 | | | | 2/7 | | 25/83 | | | | | | | | | | | | | | |
| Grado 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabla 2. Evaluación de accesiones de yuca en medio de cultivo de meristemas (4E) sobre raíces formadas, condición de las plántulas y escala general de crecimiento, después de 30 días de establecidas *in vitro*.

| Escala general (Evaluación) | Raíces formadas (Nº/%) | | | Condición de las plántulas (Nº/%) | | | Escala general de crecimiento | | |
|-----------------------------|------------------------|-----------|--------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------|---------------------|
| | Ausencia | Presencia | Número | Tamaño (mm) | Brotes sin raíces (normal) | Brotes con raíces (óptimo) | Muy pobre (0.5-1.4) | Normal (2.5-3.4) | Muy vigoroso (>4.5) |
| Grado 1 | | | | | | | | | |
| Grado 2 | | | | 1-2 | >2 | 0-20 | | | |
| Grado 3 | 23/76.7 | 7/23.3 | 21/71 | | | | | 6/20 | 15/50 |
| Grado 4 | | | 9/29 | | | | | | 9/30 |
| Grado 5 | | | | | | 30/100 | 23/76.7 | 7/23.7 | |

(grado 5) originando solamente un brote por meristema con una altura entre <5.4 a 15.4 mm (80%). El mayor número de hojas formadas fueron 2 (43%) con un tamaño de 5.5 a 10.4 (43%), mientras que 76.7% de las accesiones no formaron raíces y 23.3% que las formaron fueron 1 a 2 y con un tamaño óptimo (>20.0 mm). En general, 76.7% de las accesiones evaluadas formaron brotes sin raíces (condición normal) mientras que solamente 23.3% formaron plántulas completas (condición óptima). En la escala general de evaluación, 20% de las accesiones evaluadas tuvieron un crecimiento pobre, 50% un crecimiento normal y 30% un crecimiento vigoroso. No se registró crecimiento extremo como muy pobre o muy vigoroso.

Estos resultados muestran que el medio de cultivo 4E resultó ideal para el crecimiento y desarrollo de meristemas de yuca puesto que si bien 20% de las accesiones evaluadas tuvieron un crecimiento pobre, cuando fueron subcultivadas una a dos veces alcanzaron un crecimiento normal a óptimo. Asimismo, si bien 76.7% de las accesiones evaluadas no formaron raíces, esto no significó mayor inconveniente puesto que se formaron regularmente en el medio de cultivo de enraizamiento (17N).

El primer trabajo sobre propagación clonal de yuca por cultivo de meristemas fue realizado utilizando las sales minerales MS suplementadas con BA 0.1, ANA 0.2 y AG₃ 0.03 mg l⁻¹ (Kantha, 1974). Desde entonces se han realizado trabajos similares con la finalidad de obtener plantas libres de virus de genotipos élites (Kaiser y Teemba, 1979; Mabanza et al., 1995; Danso et al., 1999) y recientemente la erradicación del virus del rayado marrón de la yuca (Cassava brown streak virus/CBSV), donde el mejor medio de cultivo fue MS suplementado con BAP 0.5 mg l⁻¹ y 2,4-D 0.1 mg l⁻¹ (Wasswa et al., 2010). Por otro lado, trabajos sobre propagación clonal masiva de yuca utilizando yemas axilares se han realizado desde la década del 80. Segmentos nodales formaron alrededor de 7.0 brotes por explante en medio de cultivo suplementado con BAP 0.2 mg l⁻¹ y ANA 0.05 mg l⁻¹ después de tres semanas de cultivo (Smith et al., 1986). Posteriormente, las citocininas BAP, KIN, TDZ y ZEA, 10, 15 y 20 mg l⁻¹ fueron ensayadas en numerosas variedades de yuca, destacando el genotipo TMS 30555 con 63% de los explantes induciendo una media de 25 brotes en medio de cultivo MS suplementado con BAP 10 mg l⁻¹, a

partir de segmentos nodales de plántulas *in vitro* de 3 a 5 semanas de edad (Konan et al., 1994; Konan et al., 1997). Segmentos nodales también fueron utilizados en la proliferación de brotes axilares en medio de cultivo MS suplementado con BA y KIN (0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 mg l⁻¹) en combinación con ANA 0.05 mg l⁻¹, destacando la combinación BAP 1.0 mg l⁻¹ - ANA 0.05 mg l⁻¹, con una media de 5.6 brotes por explante (Abd Alla et al., 2013). Adicionalmente, medios de cultivo MS y MS/2, suplementados con las combinaciones ANA 0.01 mg l⁻¹-BAP 0.05 mg l⁻¹ y ANA 0.02 mg l⁻¹-BAP 0.1 mg l⁻¹, respectivamente, mostraron una tasa de supervivencia de 100% y una altura del brote de 1.5 cm (Mapayi et al., 2013).

Una constante observada en la composición de numerosos medios de cultivo de meristemas y micropropagación de yuca, fue el uso de auxina (ANA), citocinina (BAP) y giberelina (AG₃) y en muy bajas concentraciones, tal como también han sido utilizadas en el trabajo que se presenta, discordando con concentraciones tan altas como BAP 10 mg l⁻¹ (Konan et al., 1997) lo que puede conllevar a variación somaclonal; estos autores utilizaron también otras citocininas como TDZ y ZEA de muy alto costo y menor eficiencia en la propagación clonal.

Compuestos químicos raramente utilizados en cultivo de tejidos como los surfactantes Tween 20, Triton-X-100 and Pluronic F-68, en diferentes concentraciones, fueron incorporados al medio de cultivo MS suplementado con BAP 10 mg l⁻¹, observándose que únicamente Pluronic F-68 2.0 mg l⁻¹ indujo 83% de producción de yemas axilares y más de 10 brotes por explante (Konan et al., 1997). Asimismo, una mezcla de oligogalacturónidos (GP 7-16), conocido como Pectimorf® (5, 10 y 15 mg l⁻¹) sustituyó parcialmente el suplemento de ANA (0.01 mg l⁻¹) en el medio de cultivo de propagación de yuca, especialmente las concentraciones de 10 y 15 mg l⁻¹ (Suárez y Hernández, 2008). En esa misma dirección, fue ensayado el fertilizante foliar Easygro® suplementado con sacarosa 30 g l⁻¹, sustituyendo a las sales minerales MS, con la finalidad de disminuir costos de propagación *in vitro*, observándose una respuesta ligeramente superior en el medio de cultivo alternativo y una reducción de costos de 90% (Ogero et al., 2012).

Evaluación en el medio de cultivo 8S

En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados de la

Tabla 3. Evaluación de accesiones de yuca en medio de cultivo de conservación de germoplasma (8S) sobre viabilidad del nudo y brotes y hojas formadas, después de 30 días de establecidas *in vitro*.

| Escala general (Evaluación) | Viabilidad del nudo (Nº%) | | | Brotes formados (Nº%) | | | Hojas formadas (Nº%) | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|-------|-------|-----------------------|--------|-------------|----------------------|-------------|-----------|-------------|-------|
| | 0-21-40 | 41-60 | 61-80 | 81-100 | Número | Tamaño (mm) | Número | Tamaño (mm) | Número | Tamaño (mm) | |
| Grado 1 | | | | | 1 | >1 | <5.4 | 5.5-10.4 | 10.5-15.4 | 15.5-20.4 | >20.4 |
| Grado 2 | | | | | 1/2,5 | | | | | | |
| Grado 3 | | | | | 45/100 | | 4/9 | 16/35,5 | 7/15 | 27/60 | 21/47 |
| Grado 4 | | | | | | | | 5/11 | 8/18 | | |
| Grado 5 | | | | | 45/100 | | | 19/42 | 3/7 | | |

Tabla 4. Evaluación de accesiones de yuca en medio de cultivo de conservación de germoplasma (8S) sobre raíces formadas, formación de plántulas completas y escala general de crecimiento, después de 30 días de establecidas *in vitro*.

| Escala general (Evaluación) | Raíces formadas (Nº%) | | Plántulas completas (%) | | Escala general de crecimiento | | |
|-----------------------------|-----------------------|-----------|-------------------------|---------|-------------------------------|------------------|---------------------|
| | Ausencia | Presencia | Tamaño (mm) | Número | Muy pobre (0.5-1.4) | Normal (2.5-3.4) | Muy vigoroso (>4.5) |
| Grado 1 | | | | | | | |
| Grado 2 | | | | | | | |
| Grado 3 | 42/93.3 | | | | | 25/55.6 | |
| Grado 4 | 3/6.7 | 45/100 | 30/66.7 | 15/33.3 | | | 20/44.4 |
| Grado 5 | | | 45/100 | | | | |

evaluación de 45 accesiones de yuca nativas del Perú en medio de cultivo de conservación de germoplasma (8S). Todas las accesiones evaluadas crecieron 100% (grado 5) originando solamente una plántula por brote con una altura variable entre 10.5 a > 20.0 mm (88%). El mayor número de hojas formadas fueron 3 (58%) con un tamaño de 5.5 a 10.4 (60%), mientras que 94% de las accesiones no formaron raíces y 6% que las formaron fueron >2 y con un tamaño óptimo (>20.0 mm). En general, 67% de las accesiones evaluadas regeneraron plántulas completas (condición normal) y 33% alcanzaron una condición óptima. En la escala general de evaluación, 55% de las accesiones evaluadas tuvieron un crecimiento normal y 45% un crecimiento vigoroso. No se registró crecimiento extremo como muy pobre o muy vigoroso.

En la tabla 5 se muestra la relación de accesiones evaluadas en los medios de cultivo de meristemas (4E) y de conservación de germoplasma (8S) colectadas en diferentes regiones geográficas del Perú y en la tabla 6 se muestran las accesiones de yuca evaluadas en el medio de cultivo de conservación de germoplasma (8S) después de 3, 6, 9 y 12 meses de establecidos los cultivos, observándose que de 36 accesiones evaluadas 72.3% abarcaron periodos de conservación de 3 y 6 meses, mientras que 27.7 % abarcaron periodos de conservación de 9 y 12 meses. En todos los casos la viabilidad y supervivencia de las accesiones fue 100% cuando fueron transferidas a medio de cultivo de enraizamiento y propagación (17N).

El método de conservación de germoplasma *in vitro* consiste en mantener los cultivos en condiciones físicas y químicas que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a medios de cultivo frescos sin que se afecte la viabilidad y estabilidad genética de los cultivos (CIAT, 1984), así como reducir los costos de mantenimiento (Koo *et al.*, 2004). En el caso de la UNPRG, Lambayeque, las condiciones físicas de conservación de germoplasma de yuca se ajustaron a 28 ± 2 °C de temperatura, $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de iluminación, 16 horas de fotoperiodo y 70-80% de humedad relativa, mientras que en el CIAT, Colombia se ajustaron en 23-24 °C de temperatura, $18.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de iluminación, 12 horas de fotoperiodo y 50-70 % de humedad relativa, lo que en el medio de cultivo 8S permitió la conservación *in vitro* en una media de 11 meses (Mafla *et al.*, 2007). En nuestro estudio, tal como se muestra en la tabla 6, aun en

condiciones de temperatura e iluminación más altas, alrededor de 30% del germoplasma de yuca se conservó entre 9 a 12 meses antes del subcultivo y reinicio de un nuevo ciclo de crecimiento.

Como es conocido, la tasa de crecimiento *in vitro* puede reducirse mediante modificaciones en el medio de cultivo y/o en las condiciones ambientales. En el medio de cultivo las modificaciones incluyen dilución de los elementos minerales, reducción en la concentración de azúcar, cambios en la naturaleza y/o concentración de los reguladores de crecimiento y la adición de compuestos osmóticamente activos, a lo que se suma cambios en la reducción de la temperatura, combinada o no con un decrecimiento en la intensidad de la luz (Engelmann, 2011; Cruz-Cruz *et al.*, 2013). En el caso de la yuca se estudió el efecto combinado de la temperatura, concentración de nitrógeno total ($\text{NO}_3 + \text{NH}_4$)/carbono, concentración de reguladores de crecimiento (citoquininas y ABA) y concentración osmótica (sacarosa y manitol) (Roca, 1985); asimismo, el efecto de 5.2 a 7.9 mg l⁻¹ de ABA suplementado al medio de cultivo (Barrueto-Cid y Carvalho, 2008) y 10 mg l⁻¹ de nitrato de plata (Mafla *et al.*, 2000).

Se ha señalado que la principal ventaja de la técnica de limitación del crecimiento a tasas mínimas radica en el requerimiento de las mismas facilidades de la micropropagación, mientras que entre las principales desventajas se tiene los costos de aplicación que continúan siendo altos y el riesgo de variación somaclonal en algunas especies (Blakesley *et al.*, 1996). En las condiciones del laboratorio de la UNPRG, Lambayeque, la reducción de costos es muy significativa puesto que no se necesita disponer de algún equipo que reduzca temperatura a niveles mínimos para la especie. Una actividad adicional es la caracterización de los materiales genéticos a través de una serie de procedimientos como el uso de descriptores morfológicos y agronómicos y técnicas como las de marcadores bioquímicos, incluyendo análisis de isoenzimas, y marcadores moleculares como RFLPs, RAPDs y microsátélites (Mafla *et al.*, 2007). En la colección de la UNPRG, únicamente se utilizaron descriptores morfológicos y agronómicos. Por otro lado, Thro *et al.* (1998) informaron que la colección mundial de yuca mantenida en el CIAT (Colombia) e IITA (Nigeria), que incluyen cultivares primitivos, cultivares mejorados y material genético, superaba los 5000 y 1800

Tabla 5. Accesiones peruanas de yuca evaluadas en el medio de cultivo de meristemas (4E) y de conservación de germoplasma (8S) *in vitro*.

| Número de accesión (UNPRG/CIAT) | Nombre de la accesión | Origen | Evaluación en el medio de cultivo 4E | Evaluación en el medio de cultivo 8S |
|---------------------------------|-------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| UNPRG-1/MPER 329 | Rosada Mochera | Moche (La Libertad) | X | X |
| UNPRG-3/MPER 330 | Bandurria | Monsefú (Lambayeque) | X | X |
| UNPRG-4/MPER 331 | Blanca de Ferreñafe | Monsefú (Lambayeque) | X | X |
| UNPRG-5/MPER 332 | Tolonera | Pacasmayo (La Libertad) | X | X |
| UNPRG-6/MPER 333 | Blanca de Huacho | Lima | X | X |
| UNPRG-8/MPER 335 | Amarilla de Tejedores | Piura | X | X |
| UNPRG-9/MPER 336 | Blanca de Sullana | Piura | X | X |
| UNPRG-12/MPER 338 | Umishima Blanca | San Martín | | X |
| UNPRG-15/MPER 340 | X ₁ -L.E.E.A.L. 67 | Lambayeque | X | X |
| UNPRG-16/MPER 341 | X ₂ -L.E.E.A.L. 67 | Lambayeque | X | X |
| UNPRG-17/MPER 342 | Cajabambina Colorada | Cajamarca | X | X |
| UNPRG-22 | Colla | ? | X | X |
| UNPRG-23/MPER 342 | Cita Guazu | Paraguay? | X | X |
| UNPRG-26/MPER 337 | Provinciana | Lambayeque | | X |
| UNPRG-27/MPER 347 | Cogollo Morado | CIPA-Chiclayo (Lambayeque) | X | X |
| UNPRG-43/MPER 362 | Ushalina | Las Palmas – Tarapoto (San Martín) | | X |
| UNPRG-48/MPER 366 | YP-82-20 | Iquitos (Loreto) | | X |
| UNPRG-49/MPER 367 | Panty | Quillabamba (Cuzco) | X | X |
| UNPRG-51/MPER 369 | Pacasmayo Rumo | Santa Clara – Iquitos (Loreto) | X | X |
| UNPRG-56/MPER 372 | Umisha Rumo | San Martín | X | X |
| UNPRG-57/MPER 373 | Colorada Huallaga I | Bellavista, Huallaga Central (Huánuco) | X | X |
| UNPRG-60/MPER 375 | Morada de Perené | Perené (Junín) | | X |
| UNPRG-62/MPER 377 | Uspetón | Tarapoto (San Martín) | | X |
| UNPRG-63/MPER 429 | Valenka | Costa Rica? | X | X |
| UNPRG-66/MPER 380 | YP-82-19 | Iquitos (Loreto) | | X |
| UNPRG-68/MPER 381 | Guaxo | Brasil? | | X |
| UNPRG-73 | Arpón Rumo | ? | | X |
| UNPRG-74/MPER 386 | YP-82-10 | Iquitos (Loreto) | | X |
| UNPRG-75/MPER 387 | YP-82-04 | Iquitos (Loreto) | X | X |
| UNPRG-79/MPER 389 | Pucayuquilla | Tarapoto (San Martín) | X | X |
| UNPRG-80/MPER 390 | Montañera de Contumazá | Cajamarca | X | X |
| UNPRG-81/MPER 391 | Saucillo | Tumbes | X | X |
| UNPRG-82/MPER 392 | YP-82-08 | Iquitos (Loreto) | X | X |
| UNPRG-84/MPER 393 | Rumo Maqui | Tarapoto (San Martín) | X | X |
| UNPRG-87/MPER 431 | Cáscara Morada | Ucayali | X | X |
| UNPRG-90 | Tahua N° 1 | ? | X | X |
| UNPRG-98/MPER 403 | Pata de Paloma | Tumbes | | X |
| UNPRG-100/MPER 404 | Umisha Rumo Blanca | Tarapoto (San Martín) | | X |
| UNPRG-106/MPER 433 | YP-82-11 | Loreto | X | X |
| UNPRG-108/MPER 411 | Yuca de Cantera | E.E. Cañete (Lima) | | X |
| UNPRG-110/MPER 413 | Algarrobera Blanca | Cajamarca | | X |
| UNPRG-112/MPER 415 | Imacita T-3 | Nazareth (Amazonas) | X | X |
| UNPRG-118/MPER 419 | Negra Wo | Tingo María (Huánuco) | X | X |
| UNPRG-124/MPER 424 | Cñ.Sd. 397-69 | E.E. Cañete (Lima) | X | X |
| UNPRG-125/MPER 425 | Cñ.Sd. 371-69 | E.E. Cañete (Lima) | | X |

Tabla 6. Accesiones peruanas de yuca evaluadas en el medio de cultivo de conservación de germoplasma (8S) y determinación del periodo de conservación *in vitro*.

| Número de accesión | Nombre de la accesión | Origen | Periodo de conservación (meses)/ Porcentaje (%) | Viabilidad y supervivencia (%) |
|--------------------|------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|
| UNPRG-1/MPER 329 | Rosada Mochera | Moche (La Libertad) | 03/30.6 | 100.0 |
| UNPRG-21/MPER 345 | Amarilla de Lurín | Lima | | |
| UNPRG-28 | MVen-213 | Venezuela? | | |
| UNPRG-35/MPER 354 | Huallaga Rumo | Tarapoto (San Martín) | | |
| UNPRG-37/MPER 356 | Apurimac T-1 | Apurimac | | |
| UNPRG-73 | Arpón Rumo | ? | | |
| UNPRG85/MPER 394 | Cñ.Sd.582-69 | E.E. Cañete (Lima) | | |
| UNPRG-98/MPER 403 | Pata de Paloma | Tumbes | | |
| UNPRG-103/MPER 407 | YP-82-17 | Iquitos (Loreto) | | |
| UNPRG-106 | YP-82-11 | | | |
| UNPRG-125/MPER 425 | Cñ.Sd.371-69 | E.E. Cañete (Lima) | | |
| UNPRG-17/MPER 342 | Cajabambina Colorada | Cajamarca | 06/41.7 | 100.0 |
| UNPRG-47/MPER 365 | La Perla | Piura | | |
| UNPRG-52/MPER 370 | Cñ.Sd.80-69 | E.E. Cañete (Lima) | | |
| UNPRG-54 | Amarilla Blanca | ? | | |
| UNPRG-55/MPER 371 | Huallagana | Huallaga (Huánuco) | | |
| UNPRG-60/MPER 375 | Morada de Perené | Perené (Junín) | | |
| UNPRG-65/MPER 379 | Bandurria | E.E. Cañete (Lima) | | |
| UNPRG-68/MPER 381 | Guaxo | Brasil? | | |
| UNPRG-74/MPER 386 | YP-82-10 | Iquitos (Loreto) | | |
| UNPRG-77 | YP-82-21 | Iquitos (Loreto) | | |
| UNPRG-82/MPER 392 | YP-82-08 | Iquitos (Loreto) | | |
| UNPRG-91/MPER 398 | Ungurawi Rumo | Yurimaguas (Loreto) | | |
| UNPRG-111/MPER 414 | Cñ.Sd.250-69 | E.E. Cañete (Lima) | | |
| UNPRG-115/MPER 416 | Amarilla de Iquitos | Santa Clara, Iquitos (Loreto) | | |
| UNPRG-120 | Imacita T-7 | Imacita (Amazonas) | | |
| UNPRG-11/MPER 346 | Tarapoto T-1 | Tarapoto (San Martín) | 09/8.3 | 100.0 |
| UNPRG-79/MPER 389 | Pucayuquilla | Tarapoto (San Martín) | | |
| UNPRG-90 | Tahua N° 1 | ? | | |
| UNPRG-5/MPER 332 | Tolonera | Pacasmayo (La Libertad) | 12/19.4 | 100.0 |
| UNPRG-6/MPER 333 | Blanca de Huacho | Lima | | |
| UNPRG-20 | CADE -2 | ? | | |
| UNPRG-63/MPER 429 | Valenka | Costa Rica? | | |
| UNPRG-66/MPER 380 | YP-82-19 | Iquitos (Loreto) | | |
| UNPRG-80/MPER390 | Montañera de Contumazá | Cajamarca | | |
| UNPRG-99 | Cñ.Sd.159-69 | E.E. Cañete (Lima) | | |

genotipos, respectivamente, tanto en condiciones de campo como en el banco activo *in vitro*, que dependiendo del genotipo era posible mantener el cultivo entre 12 a 24 meses, mientras que la estabilidad genética no era afectada aun en cultivos *in vitro* mantenidos por más de 10 años. Asimismo, Debouck y Guevara (1995) informaron que CIAT no solamente conserva material genético de yuca sino también más de 300 accesiones de especies silvestres del género *Manihot*. En condiciones de campo las pérdidas del material genético suelen resultar muy significativas en comparación con las pérdidas en condiciones *in vitro* como fue el caso de la colección de yuca de la UNPRG que en agosto de 1990 el material genético se perdió totalmente por causa de una convulsión social.

Transferencia internacional de germoplasma

En la tabla 7 se presenta la relación de accesiones de yuca transferidas por cultivo de meristemas al CIAT, entre los años de 1983 a 1987, haciendo un total de 278 accesiones, 275 nativas (una accesión

sin precisarse el origen) y 3 presumiblemente introducidas de Brasil, Costa Rica y Paraguay. La mayoría de las accesiones, 152 que representaron 54.7% del total, fueron colectadas en la selva de la región Pasco, específicamente en los valles de los ríos Pichis y Palcazu por la Dra. Jean Salick (Salick Cassava Collection). En general, la mayoría de las accesiones fueron colectadas en la región selva, haciendo un total de 230 accesiones (82.7% del total), mientras que el menor porcentaje correspondió a la región andina con apenas 5 accesiones (1.8% del total). Después de Pasco las regiones de selva que más aportaron con accesiones fueron Loreto y San Martín con 27 (9.7%) y 20 (7.2%) accesiones, respectivamente.

En 1988 fueron introducidas del CIAT 249 accesiones de yuca colectadas en el Perú, 80 accesiones provenientes por cultivo de meristemas y sometidas a indización para los virus de importancia cuarentenaria como son el Mosaico Común de la yuca (CsCMV), Virus X de la yuca (CsXV) y enfermedad del Cuero de Sapo (FSD) y 169 en

Tabla 7. Germoplasma de yuca de varias regiones geográficas del Perú transferidas al CIAT (Cali, Colombia), mediante cultivo de meristemas (1983 a 1987)^{a,b}.

| Regiones geográficas | Regiones naturales | | |
|-------------------------------|--------------------|----------|------------------|
| | Costa | Sierra | Selva |
| Amazonas | | | 4 |
| Ancash | 1 | 1 | |
| Apurímac | | | 2 |
| Cajamarca | | 4 | |
| Cuzco | | | 2 |
| Huánuco | | | 6 |
| Junín | | | 4 |
| La Libertad | 3 | | |
| Lambayeque | 9 | | |
| Lima | 19 | | |
| Loreto | | | 27 |
| Pasco | | | 3 |
| Piura | 4 | | |
| San Martín | | | 20 |
| Tumbes | 3 | | |
| Ucayali | | | 10 |
| No determinada: 1 | | | |
| Otros países ^c : 3 | | | |
| Pasco ^d | | | 108 ^e |
| | | | 44 ^f |
| Total: 274+4= 278 | 39 | 5 | 230 |

^aPromedio de 1-3 tubos de ensayo por accesión y 2 plántulas por tubo de ensayo

^bAccesiones transferidas en 1983 y 1985

^cProbablemente introducidas de Brasil, Costa Rica y Paraguay

^dColecta realizada en el valle de los ríos Pichis y Palcazu por J. Salick

^eAccesiones transferidas en 1986

^fAccesiones transferidas en 1987

subcultivos sin indización (Tabla 8).

En la época en que se realizó la transferencia de material genético de yuca (1982-1987) fue suficiente el contar con los certificados fitosanitarios de salida del país (SENASA-Perú) e ingreso (ICA-Colombia) (Frison y Feliu, 1991) pero a partir del 29 de junio de 2004 entró en vigor el Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura que establece

en la evaluación de accesiones de yuca y de otras especies, mientras que la transferencia internacional de germoplasma posibilitó que estos materiales genéticos se conserven en más de una institución y más aún si consideramos que en el Perú la mayor diversidad genética de la yuca y especies del género *Manihot* se encuentran en áreas de alto riesgo por narcotráfico, terrorismo y enfermedades endémicas.

Tabla 8. Germoplasma de yuca de varias regiones geográficas del Perú transferidas del CIAT (Cali, Colombia) a la UNPRG (Lambayeque, Perú) mediante cultivo de meristemas (1988)*.

| Número | Características | Virus erradicados |
|------------|-----------------|--|
| 80 | Indizadas | Mosaico común de la yuca (CsCMV), Virus X de la yuca (CsXV) y enfermedad del Cuero de Sapo (FSD) |
| 169 | No indizadas | |
| Total: 249 | | |

*Promedio de 1-3 tubos de ensayo por accesión y 2 plántulas por tubo de ensayo

en uno de sus artículos que deberá facilitarse el acceso al amparo del Sistema Multilateral con arreglo de un Acuerdo Normalizado de Transferencia de material (SMTA) para los materiales de *Manihot esculenta* y el Acuerdo de Transferencia de Material (ATM) para las especies silvestres del género *Manihot*.

Tal como ha sido indicado por Mafla *et al.* (2007), la colección de *Manihot* del CIAT está representada por 6624 materiales que conforman tres categorías: 5212 materiales de yuca cultivada procedentes de 25 países, 883 materiales de especies silvestres del género *Manihot* (33 especies) y 529 materiales híbridos, por lo tanto, el Perú y particularmente la UNPRG-Lambayeque ha contribuido a que estos materiales genéticos se encuentren preservados y de libre disponibilidad para los investigadores en yuca, más aun en las actuales circunstancias donde ya no es posible realizar colectas de germoplasma de yuca en zonas de alto riesgo como son los valles de los ríos, Apurímac, Mantaro, Ene, Huallaga, Pichis, Palcazu, entre otros.

Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que en accesiones de yuca colectadas en el Perú los medios de cultivo 4E y 8S, formulados por el CIAT, son aplicables en gran escala en el cultivo de meristemas (4E) y en menor escala en la conservación de germoplasma (8S). El modelo de descriptor propuesto para las evaluaciones de meristemas y plántulas *in vitro* puede ser aplicado

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado parcialmente por María M. Flores Meza, a cuya memoria está dedicado. Asimismo, es un reconocimiento a la destacada labor científica del Prof. Dr. William M. Roca, uno de los que más apoyaron y divulgaron la biotecnología de plantas en América Latina y al Dr. Jhon H. Dodds. Especial gratitud al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) del Perú.

Bibliografía

- Abd Alla N.A., Ragab M.E., El-Miniawy S.E.I.-D.M., Taha H.S. 2013. In vitro studies on cassava plant micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Applied Sciences Research* 9:811-820.
- Adejare G.O., Coutts R.H.A. 1981. Eradication of cassava mosaic disease from Nigerian cassava clones by meristem-tip culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1:25-32.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.
- Barrueto Cid L.P., Carvalho LL.C.B. 2008. Importance of abscisic acid (ABA) in the in vitro conservation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Chilean Journal of Agricultural Research* 68:304-308.
- Blakesley D., Pask N., Henshaw G.G., Fay M.F. 1996. Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: In vitro strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regulation* 20:11-16.
- Ceballos H, De la Cruz H. 2002. Taxonomía y morfología de la yuca. En Ospina B., Ceballos H. (Comps.). *La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción,*

- procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Cali, Colombia. Pp. 17-33
- Cronquist A. 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Second Edition. The New York Botanical Garden, USA. 555 p.
- Cruz-Cruz C.A., González-Armao M.T., Engelmann F. 2013. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. Resources 2:73-95.
- Danso K.E., Acheampong E., Amoatey H.M. 1999. Selection and in-vitro propagation of five cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. Journal of the Ghana Science Association 1:31-41.
- Debouck D., Guevara C. 1995. Unidad de Recursos genéticos. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 16 p. (Multicopiado).
- Delgado G.E., Rojas C. 1993. Cassava "seed" production program by meristem culture in UNPRG, Lambayeque, Peru. In: Proceedings of the First International Scientific Meeting, Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia, 25-28 August 1992. Thro, AM and Roca W (eds.), pp. 146-148. CIAT Working Doc. No 123, 496 p.
- Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cellular & Developmental Biology.- Plant 47:5-16.
- Escobar R.H., Mafla G., Roca W.M. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. Plant Cell Reports 16:474-478.
- Frison E.A. 1994. Sanitation techniques for cassava. Tropical Science 34:146-153.
- Frison, EA, Feliu E (1991) FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of cassava germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO- and International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- Fukuda W.M.G., Guevara C.L. 1998. Descriptores morfológicos e agronómicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 38 p. (EMBRAPA-CNPMP. Documentos, 78).
- Guo J-Y, Liu Y.O. 1995. Rapid propagation of cassava by tissue culture and its application in rural distribution in China. In Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia. CIAT working document 150, 183-189.
- Gulick P., Hershey D., Esquinas Alcazar J. 1983. Genetic resources of cassava and wild relatives. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) Secretariat. 56 p.
- Kaiser W.J., Teemba L.R. 1979. Use of tissue culture and thermotherapy to free East African cassava cultivars of African cassava mosaic and cassava brown streak diseases. Plant Disease Reports 63:780-784.
- Kartha K.K., Gamborg O.L., Constable F., Shyluk J.P. 1974. Regeneration of cassava plants from apical meristems. Plant Science Letters 2:107-113.
- Koo B., Pardey P.G., Debouck D.G. 2004. CIAT Genebank. "Saving seeds - The economics of conserving crop genetic resources ex situ in the Future Harvest Centres of the CGIAR". Koo B, Pardey PG & Wright BD (eds.), CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. Pp. 105-125.
- Konan N.K., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. 1994. Efficient in vitro shoot regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plant Breeding 113:227-236.
- Konan N.K., Schöpke C., Cárcamo R., Beachy R.N., Fauquet C. 1997. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. Plant Cell Reports 16:444-449.
- Mabanza J., Rodríguez-Andriyani A.V., Mahouka J., Boumba B. 1995. Evaluation of cleaned cassava varieties in Congo. In: The cassava biotechnology network. Proceedings of the Second International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia, 22-26 August 1994. Vol. 1, pp. 194-201. CIAT, Cali.
- Mafla G., Roa J.C., Guevara C.L. 2000. Advances on the in vitro growth control of cassava using silver nitrate. In: Carvalho L.J.C.B., Thro A.M., Vilarinhos A.D., eds. Proceedings IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Salvador, Bahia, Brazil. November 03-07, 1998. EMBRAPA, CENARGEN and CBN. Brasília, Brazil. Pp 439-446.
- Mafla G., Roa J.C., Aranzales E., Debouck D.G. 2007. Manual de procedimientos para la conservación in vitro del germoplasma del género *Manihot*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 50 p.
- Mapayi E.F., Ojo D.K., Oduwaye O.A., Porbeni J.B. 2013. Optimization of in-vitro propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. Journal of Agricultural Science 5:261-269.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Ogero K.O., Mburugu G.N., Mwangi M., Ombori O., Ngugi M. 2012. In vitro micropropagation of cassava through low cost tissue culture. Asian Journal of Agricultural science 4:205-209.
- Puonti-Kaerlas J. 1998. Cassava Biotechnology. In: Biotechnology Genetic Engineering Reviews 15:330-364. Taylor and Francis Group.
- Roca W.M. 1980. El cultivo de meristemas de yuca. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 40 p.
- Roca W.M. 1985. Conservación in vitro. Lecturas sobre Recursos Fitogenéticos No 3. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (CIRF), Cali, Colombia. 46 p.
- Roca W.M., Chávez R., Marin M.L., Arias D.I., Mafla G., Reyes R. 1989. In vitro methods of germplasm conservation. Genome 31:813-817.
- Shahin E.A., Shepard J.F. 1980. Cassava mesophyll protoplast: isolation, proliferation and shoot formation. Plant Science Letters 17:459-465.
- Smith M.K., Biggs B.J., Scott K.J. 1986. In vitro propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6:221-228.
- Suárez L., Hernández M.M. 2008. Efecto de una mezcla de oligogalacturonidos en la propagación in vitro de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), var. CMC-40. Cultivos Tropicales 29:47-52.
- Thro A.M., Roca W., Iglesias C., Henry G., Ng S.Y.C. 1998. Contributions of in-vitro biology to cassava improvement. African Crop Science Journal 6:303-315.
- Tilquin J.P. 1979. Plant regeneration from stem callus of cassava. Canadian Journal of Botany 57:1761-1763.
- Wasswa P., Alicai T., Mukasa S.B. 2010. Optimization of in vitro techniques for cassava brown streak virus elimination from infected cassava clones. African Crop Science Journal 18:235-241.