

Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del clon de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001'

Diosdada Gálvez Guerra*, Manuel Cabrera Jova, Yoel Beovides García, Ania Robaina Jiménez, Sergio Rodríguez Morales, Daniel Rodríguez Pérez. *Autora para correspondencia.

Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP 53 000, Villa Clara, Cuba. e-mail: propag.biotec@inivit.cu

RESUMEN

El nuevo clon de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001', obtenido por el programa de mejoramiento genético del INIVIT, ha presentado altos porcentajes de pérdidas en la fase de establecimiento *in vitro*, principalmente por contaminación microbiana. El objetivo de este trabajo fue establecer yemas axilares del clon de malanga 'INIVIT MC-2001' con bajos porcentajes de contaminación microbiana y mortalidad de los explantes. Para la desinfección se estudiaron seis tratamientos, utilizando diferentes concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) y agua ozonificada. Además, se determinó la influencia de la concentración de 6-BAP (0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 mg l⁻¹ de 6-BAP) en el medio de cultivo. Con el empleo del hipoclorito de sodio al 3.0% para la desinfección de los cormos de malanga durante 25 minutos se logró disminuir el porcentaje de contaminación microbiana y obtener una eficiencia en el establecimiento de los ápices de yemas axilares del 85.38%. Al emplear el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS, con 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP a los 29 días se lograron explantes con las características morfológicas adecuadas para pasar a la fase de multiplicación.

Palabras clave: *Colocasia*, ozono, yemas axilares.

In vitro establishment of axillary buds of *Colocasia esculenta* Schott clone 'INIVIT MC-2001'

ABSTRACT

The new *Colocasia esculenta* Schott clone 'INIVIT MC-2001', obtained by the INIVIT breeding program, presented high percentages of losses in the *in vitro* establishment phase, mainly by microbial contamination. The aim of this study was to establish axillary buds of taro clone 'INIVIT MC-2001' with low percentages of microbial contamination and explants mortality. For disinfection, six treatments were studied using different concentrations and times of immersion in sodium hypochlorite (NaClO) and ozonized water. Furthermore, the influence of the concentration of 6-BAP (0.1, 0.3, 0.5 and 1.0 mg l⁻¹ of 6-BAP) in the culture medium was determined. With the use of 3.0% sodium hypochlorite for the disinfection of taro corms for 25 minutes we were able to reduce the percentage of microbial contamination and gain efficiency in the establishment of the apices of axillary buds of 85.38%. By employing the culture medium consisting of MS salts and vitamins, with 0.5 mg l⁻¹ 6-BAP at 29 days of culture, the explants were achieved the morphology characteristics for transferring to the multiplication phase.

Keywords: axillary buds, *Colocasia*, ozone.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el traslado indiscriminado de semillas de malanga entre las distintas provincias del país ha diseminado los principales agentes patógenos lo que ha provocado serias afectaciones sanitarias en las plantaciones (Rodríguez, 2010).

El uso de los métodos biotecnológicos constituye una herramienta auxiliar muy importante para la multiplicación de material

vegetal libre de enfermedades (González, 2005). Esta vía ha servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante selección, mutación, programas de mejora y manipulación genética (Cañal, 1999). Una de las alternativas para lograr incrementar los rendimientos en este cultivo, puede ser la aplicación de los métodos biotecnológicos, tanto para la obtención de nuevos genotipos, como para el saneamiento a patógenos y producción de semillas (García *et al.*, 1999).

Varios clones de malanga han sido propagados usando la técnica del cultivo *in vitro* vía organogénesis directa a través de yemas axilares (García *et al.*, 1999; Dottin, 2000; Chien-Ying *et al.*, 2008). Sin embargo, el nuevo clon de malanga 'INIVIT MC-2001', con alto potencial productivo, obtenido por el programa de mejoramiento genético del INIVIT, ha presentado altos porcentajes de pérdidas en la fase de establecimiento *in vitro*, principalmente por contaminación microbiana, con los protocolos empleados en experimentos preliminares. Estos aspectos podrían limitar la entrega de explantes con calidad fisiológica y sanitaria de este nuevo clon del género *Colocasia* a las biofábricas. Por ello, se requieren alternativas para mejorar la eficiencia de esta fase del proceso. El objetivo de este trabajo fue establecer yemas axilares del clon de malanga 'INIVIT MC-2001' con bajos porcentajes de contaminación microbiana y mortalidad de los explantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas del clon de malanga 'INIVIT MC-2001', seleccionadas de las áreas de semillas certificadas del INIVIT, por sus características morfológicas típicas del clon, sanidad y respuesta de rendimiento en campo.

Medios de cultivo

Para el desarrollo de los experimentos, se empleó como medio de cultivo basal, el compuesto por las sales inorgánicas y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (Murashige y Skoog 1962) (MS). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 con NaOH 0.5 mol l⁻¹ o HCl 0.5 mol l⁻¹ antes de la esterilización en autoclave.

Los medios de cultivo y sistemas de cultivos que se emplearon en los experimentos se esterilizaron por vapor en autoclave vertical (BK-75) a 121°C y 1.20 kg cm⁻².

Desinfección

Con el objetivo de desinfectar los ápices de las yemas axilares para lograr su establecimiento *in vitro*, se estudiaron seis tratamientos, donde se incluyeron diferentes concentraciones y

tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) y agua ozonificada.

Tratamientos: Inmersión en alcohol (70%) + inmersión en NaClO (2.5%) durante 10 minutos (Control), Inmersión en NaClO (2.5%) durante 15 minutos, Inmersión en NaClO (3.0%) durante 15 minutos, Inmersión en NaClO (3.0%) durante 25 minutos, Inmersión en NaClO (3.0%) durante 35 minutos, Inmersión en agua ozonificada 27.4 mg l⁻¹ durante 25 minutos.

En cada uno de los tratamientos se desinfectaron 15 cormos y se establecieron *in vitro* 150 ápices de las yemas axilares por tratamiento. Se colocó un explante por tubo de ensayo, que contenía 10 ml del medio de cultivo compuesto por las Sales y vitaminas MS y 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP (García *et al.*, 1999).

A los 30 días de cultivo se contabilizó y se expresó el resultado final del número de tubos de ensayo contaminados por bacterias y hongos, así como el número de explantes muertos. Este experimento tuvo cinco repeticiones por tratamientos en el tiempo.

Influencia de la concentración de 6-BAP

Con el objetivo de estimular el crecimiento de los ápices de las yemas axilares, para que en la menor brevedad de tiempo pudieran pasar a la fase de multiplicación, se determinó la influencia de la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo en la fase de establecimiento.

Tratamientos: Sales y vitaminas MS + 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP (Control), Sales y vitaminas MS, Sales y vitaminas MS + 0.3 mg l⁻¹ de 6-BAP, Sales y vitaminas MS + 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP, Sales y vitaminas MS + 1.0 mg l⁻¹ de 6-BAP.

Los cormos fueron desinfectados según la mejor variante obtenida en el experimento anterior. Se establecieron *in vitro* 50 ápices de las yemas axilares por cada tratamiento. Se colocó un explante por tubo de ensayo según el medio de cultivo líquido correspondiente.

Se evaluó, cada siete días a partir de 15 días de establecidos los explantes y hasta los 36 días que duró el experimento, el número de explantes que presentaban las características morfofisiológicas adecuadas, con al menos

dos hojas expandidas, para pasar a medio de cultivo de multiplicación.

Análisis estadísticos

Cuando los datos cumplían el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianza se realizaron análisis estadístico de varianza simple y se empleó la prueba de *Tukey*. En caso contrario los datos fueron procesados mediante la prueba de *Kruskall Wallis*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección

El manejo, la concentración y el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio influyeron sobre la desinfección de los ápices de las yemas axilares de malanga establecidos *in vitro*.

Entre los desinfectantes se obtuvieron los mejores resultados con el hipoclorito de sodio al 3.0%, sin diferencias significativas entre un tiempo de exposición de 25 y 35 minutos, en cuanto al número de ápices de yemas axilares contaminados por bacterias y hongos, pero sí con respecto al número de ápices de yemas axilares muertos.

Con el empleo del hipoclorito de sodio al 3.0% para la desinfección de los cormos de malanga durante 25 minutos, se lograron integralmente los mejores resultados en cuanto al establecimiento de los ápices de yemas axilares a los 30 días de cultivo (Tabla 1).

Con el empleo de hipoclorito de sodio al 3.0% y un tiempo de 25 minutos de exposición de los cormos de malanga ante este desinfectante, se logró que de 150 ápices de yemas axilares a establecer *in vitro* solo se perdieran por contaminación microbiana o muertes 21.93 de ellos. Se logró una eficiencia de establecimiento de los ápices de las yemas axilares del clon de malanga 'INIVIT MC-2001' de un 85.38% (Figura 1).

El hipoclorito de sodio ha sido usado tradicionalmente solo o en combinación con otros desinfectantes en la desinfección de los materiales vegetales a establecer *in vitro*. En cada protocolo para el establecimiento de especies vegetal es necesario ajustar la concentración y el tiempo de exposición. Por lo general se han usado concentraciones desde 1.0 a 6.0% en dependencia de las características morfológicas e higiénica del material vegetal a establecer (Janse, 2007).

Los resultados en cuanto a la desinfección de los ápices de las yemas axilares del clon de malanga 'INIVIT MC-2001' se corresponden con los descritos para el establecimiento *in vitro* de 25 clones de *Colocasia esculenta* var. *esculenta* que fueron conservados *in vitro* (Huang *et al.*, 2007). Estos autores emplearon el hipoclorito de sodio al 3.0%, en un periodo de tiempo que varió de 20 a 30 minutos para la desinfección de las yemas brotadas de los cormos y obtuvieron eficiencias en cuanto al establecimiento entre 70 y 83%.

Tabla 1. Influencia del manejo de la desinfección del material vegetal sobre el número de explantes de malanga *Colocasia* clon 'INIVIT MC-2001' contaminados a los 30 días de cultivo.

Tratamientos	Bacterias		Hongos		Muertos	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
1. Alcoh. (70%) + NaClO (2.5%), 10 min (Control)	25.04	50.23 c	4.23	40.80 b	3.40	41.44 a
2. NaClO (2.5%) 15 min	28.12	60.34 d	5.45	60.78 c	2.98	40.45 a
3. NaClO (3.0%) 15 min	24.89	53.14 c	8.12	70.23 d	4.67	45.67 b
4. NaClO (3.0%) 25 min	17.35	32.11 a	1.24	21.42 a	3.34	42.34 a
5. NaClO (3.0%) 35 min	16.89	34.45 a	1.67	26.12 a	10.12	80.42 c
6. H ₂ O+Ozono 25 min	22.34	48.50 b	5.78	62.45 c	14.12	90.12 c

Rangos medios con letras no comunes en una misma columna difieren según prueba de *Kruskall Wallis* para $p < 0.05$ ($n = 150$).

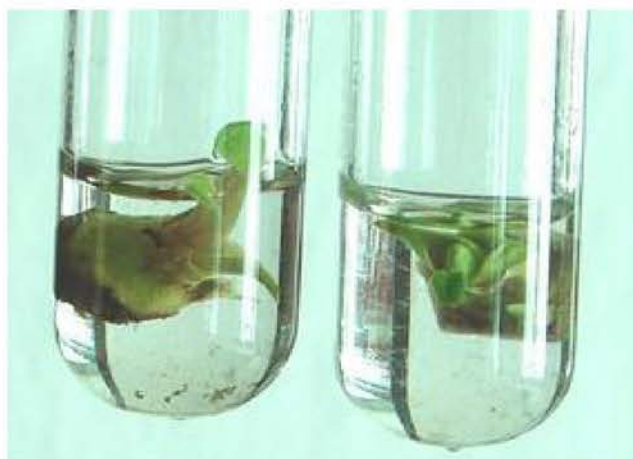


Figura 1. Explantes de malanga del clon 'INIVIT MC-2001' libres de contaminación microbiana a los 30 días en el medio de cultivo.

Aunque, en este trabajo se corroboró que el hipoclorito de sodio es un potente desinfectante y que aún tiene efecto sobre un amplio rango de microorganismos se demostró por primera vez el empleo del agua ozonificada como una alternativa para desinfección de material vegetal de malanga a establecer *in vitro*. No obstante, aún debe ser más investigada y ajustar su protocolo para su empleo en la desinfección de la malanga, por constituir una alternativa de desinfección amigable y en armonía con la salud humana y el medio ambiente.

Influencia de la concentración de 6-BAP

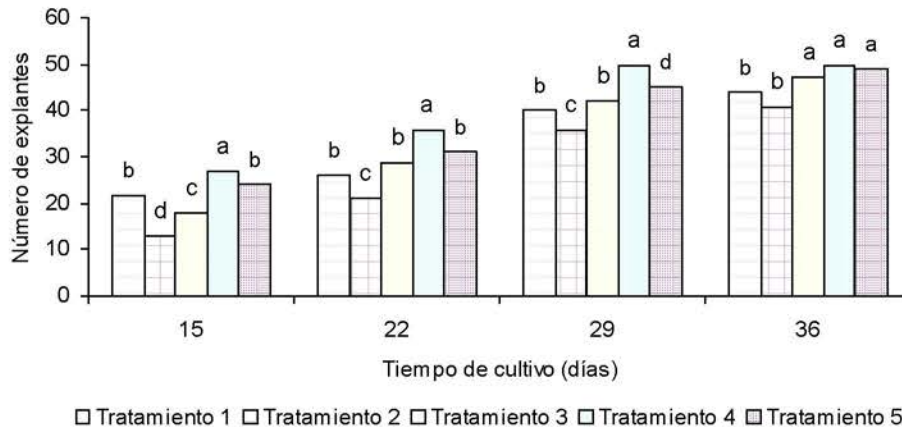
La concentración de 6-BAP en el medio de cultivo influyó en el crecimiento de los ápices de las yemas axilares durante la fase de establecimiento. Cuando se empleó el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS, con 0.5 mg l^{-1} de 6-BAP (tratamiento 4) se logró que de 50 ápices de yemas axilares, en todos los tiempos de evaluación se obtuviera el mayor número de explantes con características morfofisiológicas que les permitían pasar a medio de cultivo de multiplicación en estado semisólido con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Figura 2).

A los 29 días de cultivo el 100% de los explantes establecidos en dicho medio de cultivo (tratamiento 4) presentaban una coloración verde típica del clon de malanga objeto de investigación, existía en ellos la

emisión de al menos un par de hojas en estado juvenil y la presencia de yemas axilares brotadas (Figura 3). Explantes con estas características morfológicas permitieron que se les realizara con el bisturí una disección transversal para que pudieran ser colocados en el medio de cultivo de multiplicación.

En las demás variante de medios de cultivo con diferentes concentraciones de 6-BAP fue necesario esperar hasta los 36 días de cultivo, tiempo tope de desarrollo del experimento de establecimiento, para que se lograra el mayor número de ápices de yemas axilares por tratamiento listos para pasar a medio de cultivo de multiplicación.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Simpson (2006) en que usualmente en los ápices, la citoquinina endógena es muy baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces. Por ello, la adición exógena en los medios de cultivo de establecimiento es esencial para el proceso de división celular, citocinesis (división del citoplasma para formar dos células hijas). En estudios sobre la influencia de las hormonas en la síntesis del ADN y división celular se observó que aun cuando las auxinas eran necesarias para que hubiera mitosis y síntesis de ADN, mitosis y citocinesis solo se producían cuando habían niveles adecuados de citoquininas por la influencia que podrían ejercer sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y de proteínas (Jackson, 2005).



Medias con letras no comunes en las barras difieren según prueba de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ ($n = 50$).

Figura 2. Influencia de la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo y el momento de cultivo en el cual el mayor número de explantes lograron las características morfofisiológicas adecuadas para pasar a medio de cultivo de multiplicación. Tratamientos: 1. Sales y vitaminas MS + 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP (Control), 2. Sales y vitaminas MS; 3. Sales y vitaminas MS + 0.3 mg l⁻¹ de 6-BAP; 4. Sales y vitaminas MS + 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP; 5. Sales y vitaminas MS + 1.0 mg l⁻¹ de 6-BAP.



Figura 3. Características morfológicas de los explantes de malanga en cada uno de los medios de cultivo evaluados a los 29 días de cultivo. Tratamientos: 1. Sales y vitaminas MS + 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP (Control), 2. Sales y vitaminas MS; 3. Sales y vitaminas MS + 0.3 mg l⁻¹ de 6-BAP; 4. Sales y vitaminas MS + 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP; 5. Sales y vitaminas MS + 1.0 mg l⁻¹ de 6-BAP.

En cultivo *in vitro* de los ápices de malanga se han empleado concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo de establecimiento que varía desde 0.1 hasta 2.0 mg l⁻¹ (Dotin, 2000; Rodríguez *et al.*, 2009). Sin embargo, autores como Huang *et al.* (2007) usaron para el establecimiento de cultivares de *Colocasia esculenta* var. *esculenta*

una concentración de 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP en medio de cultivo constituido por sales y vitaminas MS. Los materiales vegetales establecidos por estos autores estuvieron listos para emplear como explantes en posteriores experimentos de multiplicación y formación de callos luego de cuatro semanas de cultivo.

CONCLUSIONES

Con el empleo del hipoclorito de sodio al 3.0% para la desinfección de los cormos de malanga durante 25 minutos se logró disminuir el porcentaje de contaminación microbiana y obtener una eficiencia en el establecimiento de los ápices de yemas axilares del 85.38%. Se determinó emplear el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS, en la fase de establecimiento con 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP que a los 29 días proporcionó explantes con las características morfológicas adecuadas para pasar a la fase de multiplicación.

REFERENCIAS

- Cañal, M (1999) Fisiología del cultivo *in vitro*. Libro de reportes cortos del 5to coloquio internacional de Biotecnología vegetal, pp. 14-22. IBP, Santa Clara, Cuba
- Chien-Ying K, Ji-Ping K, Mc Donald R (2008) *In vitro* micropropagation of white dasheen (*Colocassia esculenta*). African Journal of Biotechnology 7(1): 041-043
- Dottin, M (2000) Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis presentada para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba
- García M, Mederos V, Rodríguez S, López J, Ventura J, Cabrera M, Hernández R, González JE, Bermúdez D, Gálvez D, Gutiérrez V, Gálvez JR (1999) Generalización de la metodología para la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. Libro de reportes cortos del 5to coloquio internacional de Biotecnología vegetal, pp. 167-169. IBP, Santa Clara, Cuba
- González, J E (2005) Diagnóstico de enfermedades virales pertenecientes al género de los potivirus en los genotipos de ñame 'Pacala Duclos (*Dioscorea alata* L.) y ñame de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir.). Aplicación de la corriente eléctrica al saneamiento. Tesis presentada en opción del título de Master en Ciencias. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Cuba, 57p.
- Huang, C H, W C Hu, T C Yang, Y C Chang (2007) Zantedeschia mild mosaic virus, a new widespread virus in calla lily, detected by ELISA, dot blot hybridization and IC-RT-PCR. Plant Pathol. 56: 186-189
- Jackson, MB (2005) Aeration stress in plant tissue cultures. En: Hvoslef-Eide AK y Preil W (Ed) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 459-473. Springer. Dordrecht
- Janse, J D (2007) Phytobacteriology: Principles and Practice. CABI Publishing. Wallingford
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
- Rodríguez Arlene, Rodríguez A, Quintero S (2009) Caracterización de germoplasma y mejoramiento participativo en especies de raíces y tubérculos alimenticios tropicales y en musáceas. Simposio Internacional y Taller de Fitomejoramiento Participativo en América Latina y el Caribe. Ecuador, Quito. 31 Agost- 8 Sept.
- Rodríguez, S (2010) El cultivo de la malanga isleña (*Colocasia esculenta*) en Cuba. Conferencia Consejo Técnico Asesor, MINAG. INIVIT. 15 p.
- Simpson, G (2006) Plant Systematics. Chapter 7. Diversity and classification of flowering plants: amborellales, nymphaeales, austrobaileyales, magnoliids, ceratophyllales, and monocots, pp.137-226. Elsevier Academic Press. Amsterdam

Recibido: 10-1-2013

Aceptado: 7-3-2013