

Influencia de reguladores del crecimiento y el estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* clon 'INIVIT MC2001'

Diosdada Galvez Guerra*, Manuel Cabrera Jova, Yoel Beovides, Ania Robaina Jiménez, Sergio Rodríguez, Daniel Rodríguez. *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

Para lograr resultados adecuados en la multiplicación *in vitro* de cultivares de malanga se requiere estandarizar las condiciones de cultivo. El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de reguladores de crecimiento y del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* clon 'INIVIT MC2001'. Se establecieron cinco tratamientos que incluyeron ácido indol acético (AIA) y 6-bencilaminopurina (6-BAP): 1.0 mg l⁻¹ de AIA + 3.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 3.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 5.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 1.0 mg l⁻¹ de AIA + 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP. A los 30 días de cultivo se calculó el coeficiente de multiplicación. Además, se determinó el efecto del estado físico del medio de cultivo sobre esta misma variable durante tres subcultivos. Cuando se empleó el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS con 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP se obtuvo el mayor coeficiente de multiplicación. El manejo del estado físico del medio de cultivo durante tres subcultivos influyó sobre el coeficiente de multiplicación en cada subcultivo, en el coeficiente de multiplicación promedio de los tres subcultivos y en el número total de explantes obtenidos luego de los tres subcultivos. Con el medio de cultivo en estado semisólido se logró un mejor crecimiento de los explantes y mayor coeficiente de multiplicación.

Palabras clave: AIA, 6-BAP, malanga, medio de cultivo semisólido.

Influence of growth regulators and physical state of the culture medium on the *in vitro* multiplication of *Colocasia esculenta* clone 'INIVIT MC2001'

ABSTRACT

To achieve adequate results in the *in vitro* multiplication of taro cultivars is required to standardize the culture conditions. The aim of this study was to determine the influence of growth regulators and physical state of the culture medium on *in vitro* multiplication of *Colocasia esculenta* clone 'INIVIT MC2001'. Five treatments involving indole acetic acid (IAA) and 6-benzylaminopurine (6-BAP) were established: 1.0 mg l⁻¹ IAA + 3.0 mg l⁻¹ 6-BAP, 3.0 mg l⁻¹ 6-BAP, 4.0 mg l⁻¹ 6-BAP, 5.0 mg l⁻¹ 6-BAP, 1.0 mg l⁻¹ IAA + 6.0 mg l⁻¹ 6-BAP. After 30 days of culture the multiplication coefficient was calculated. Furthermore, the effect on the physical state of the culture medium on this variable during three subcultures was determined. When the culture medium consisting of MS salts and vitamins with 4.0 mg l⁻¹ of 6-BAP was used the greater multiplication coefficient was obtained. Handling the physical state of the culture medium for three subcultures influenced the multiplication coefficient in each subculture, in average coefficient multiplication of three subcultures and the total number of explants obtained after three subcultures. With the culture medium in semisolid state better growth and higher explants multiplication coefficient was achieved.

Key words: AIA, 6-BAP, taro, semisolid medium.

INTRODUCCIÓN

Las malangas (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta* Schott) han formado parte de la dieta del cubano por sus características organolépticas y demostrada digestibilidad. Los clones del género *Colocasia esculenta*, conocidos como 'malanga isleña' se destacan por su adaptabilidad a suelos 'tipo Gley', ciclo de cosecha entre 9 y 11 meses y su elevado potencial productivo. Esto brinda la posibilidad

de ampliar la oferta de esta vianda en el mercado durante los 12 meses del año (Rodríguez *et al.*, 2009).

El nuevo clon de malanga 'INIVIT MC-2001', obtenido por el programa de mejoramiento genético del INIVIT tiene alto potencial productivo. Para que esté al alcance de los productores se requiere disponer de suficiente material vegetal que puede ser obtenido mediante métodos biotecnológicos.

Diferentes cultivares de malanga (*Colocasia y Xathosoma*) han sido propagados por cultivo *in vitro* (Gómez *et al.*, 1991; Matehus *et al.*, 2006; Chien-Ying *et al.*, 2008; Vilchez *et al.*, 2009; Verma y Cho, 2010). A partir de los resultados de estos trabajos se destaca la importancia de estandarizar las condiciones de cultivo para lograr resultados adecuados. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de reguladores de crecimiento y del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* clon 'INIVITC2001'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon explantes de *Colocasia esculenta* clon 'INIVITC2001' establecidos *in vitro* a partir de yemas axilares según el protocolo descrito por Galvéz *et al.* (2013) con 29 días de cultivo.

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 (1962) (MS). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 con NaOH 0.5 mol l⁻¹ y/o HCl 0.5 mol l⁻¹ antes de la esterilización en autoclave.

Influencia del tipo y concentración de reguladores de crecimiento

Con el objetivo de estimular la brotación de las yemas axilares y la multiplicación de los explantes, se determinó la influencia del tipo y concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para la fase de multiplicación. Se establecieron cinco

tratamientos que incluyeron ácido indol acético (AIA) y 6-bencilaminopurina (6-BAP): 1.0 mg l⁻¹ de AIA + 3.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 3.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 5.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 1.0 mg l⁻¹ de AIA + 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP.

Se utilizaron un total de 60 explantes por cada tratamiento. Se colocaron dos explantes por frasco de cultivo según el medio de cultivo correspondiente en estado semisólido.

Se calculó a los 30 días de cultivo el coeficiente de multiplicación (CM), por cada tratamiento, al contabilizar el número total de explantes y dividirlos por el número inicial.

Efecto del estado físico del medio de cultivo

Para determinar el efecto del estado físico del medio de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación se realizó un experimento durante tres subcultivos (Tabla 1).

Se utilizó el medio de cultivo de multiplicación con el cual se obtuvieron los mejores resultados en el acápite anterior. El experimento comenzó con un número inicial de 30 explantes por tratamiento. Cada 30 días se realizó el subcultivo y se determinó el coeficiente de multiplicación al contabilizar el número total de explantes y dividirlos por el número inicial de ellos. Luego de tres subcultivos se contabilizó el número total de explantes por cada tratamiento.

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 para comparar las medias. En caso contrario los datos fueron procesados mediante una prueba de Kruskal Wallis.

Tabla 1. Tratamientos conformados para determinar el efecto del estado físico del medio de cultivo.

Tratamientos	Subcultivos		
	Primero	Segundo	Tercero
1	Semisólido	Semisólido	Semisólido
2	Líquido	Líquido	Líquido
3	Semisólido	Líquido	Semisólido
4	Líquido	Semisólido	Líquido

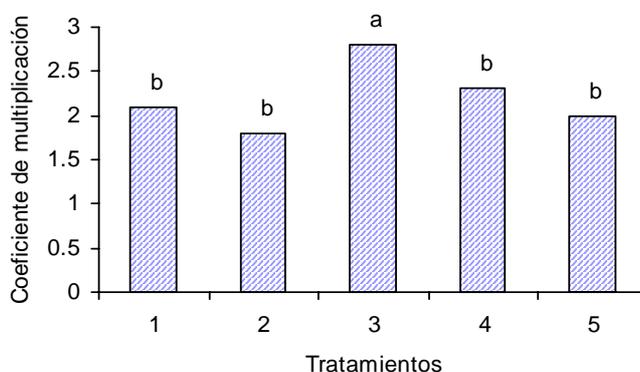
RESULTADOS

Influencia del tipo y concentración de reguladores de crecimiento

El tipo y concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo influyó en el coeficiente de multiplicación de los explantes de malanga. Cuando se empleó el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS con 4.0 mg l^{-1} de 6-BAP se lograron a los 30 días de cultivo en fase de multiplicación los mejores resultados, en cuando al coeficiente de multiplicación de los explantes (2.80) con diferencias significativas respecto al resto de las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Figura 1 y 2).

Efecto del estado físico del medio de cultivo

El manejo del estado físico del medio de cultivo durante tres subcultivos influyó sobre el coeficiente de multiplicación en cada subcultivo, en el coeficiente de multiplicación promedio de los tres subcultivos y en el número total de explantes obtenidos luego de los tres subcultivos. Cuando en los tres subcultivos se utilizó el medio de cultivo en estado semisólido (Figura 3) se logró mejor crecimiento de los explantes de malanga, se obtuvo un coeficiente de multiplicación promedio luego de tres subcultivos de 3.07 y a partir de 30 explantes iniciales fue posible obtener un promedio de 810.60 explantes, con diferencias significativas respecto al resto de tratamientos (Tabla 2).



Medias con letras no comunes en las barras difieren según prueba de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ ($n=60$).

Figura 1. Influencia del tipo y concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación de explantes de malanga (*Colocacia esculenta*) clon 'INIVITC2001' a los 30 días de cultivo. Tratamientos: 1. 1.0 mg l^{-1} de AIA + 3.0 mg l^{-1} de 6-BAP, 2. 3.0 mg l^{-1} de 6-BAP, 3. 4.0 mg l^{-1} de 6-BAP, 4. 5.0 mg l^{-1} de 6-BAP, 5. 1.0 mg l^{-1} de AIA + 6.0 mg l^{-1} de 6-BAP.



Figura 2. Explantes de malanga (*Colocacia esculenta*) clon 'INIVIT MC-2001' multiplicados en el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS con 4.0 mg l^{-1} de 6-BAP a los 30 días de cultivo.



Figura 3. Explantes de malanga (*Colocacia esculenta*) clon 'INIVIT MC-2001' multiplicados en medio de cultivo semisólido cada 30 días de cultivo.

Tabla 2. Efecto del estado físico del medio de cultivo durante tres subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación y el número total de explantes de malanga (*Colocacia esculenta*) clon 'INIVIT MC-2001'.

Tratamientos	Coeficiente de multiplicación (CM)			CM Promedio	Número total de explantes
	Primer subcultivo	Segundo subcultivo	Tercer subcultivo		
1. S+S+S	2.68	3.12	3.43	3.07 a	810.60 a
2. L+L+L	1.23	1.34	1.02	1.19 d	50.34 d
3. S+L+S	2.62	1.45	3.12	2.39 b	350.50 b
4. L+S+L	1.20	2.00	1.12	1.44 c	80.64 c

Medias con letras no comunes en una misma fila difieren según prueba de Tukey para $p < 0.05$. S-medio de cultivo semisólido, L-medio de cultivo líquido.

DISCUSIÓN

El medio de cultivo con 4.0 mg l^{-1} de 6-BAP tuvo el mayor valor de brotes por explantes con un coeficiente de multiplicación de 3.07, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Al respecto, en la literatura científica consultada los autores que emplean el 6-BAP para la multiplicación *in vitro* de esta especie, en concentraciones que varían de 0.5 - 4.3 mg l^{-1} (Gómez *et al.*, 1991; Hussain y Tyagi, 2006; Matehus *et al.*, 2006; Verma y Cho, 2010; Navarro, 2013) y en algunos casos lo combinan con auxinas como AIA y ANA (Hussain y Tyagi, 2006; Verma y Cho, 2010). Sin embargo, los coeficientes de multiplicación informados son superiores (4.6 - 11.9) en la mayoría de los casos a los obtenidos en el presente trabajo, lo cual podría ser debido a la influencia del genotipo.

Por otra parte, los resultados del presente trabajo fueron contrarios a lo señalado por Vilchez *et al.* (2009), pero en la especie de malanga *Xanthosoma sagittifolium*. Estos

autores argumentaron que la inducción de nuevos brotes estaba directamente relacionada con la incorporación de 6-BAP en el medio de cultivo, ya que las concentraciones superiores a 5.0 y 6.0 mg l^{-1} de 6-BAP tuvieron una influencia negativa en el coeficiente de multiplicación.

Otro factor importante que se observó es que a medida que aumentó el número de subcultivos en medio de cultivo semisólido hubo una tendencia al incremento del número de brotes generados por explante, con resultados superiores al resto de los tratamientos. Los resultados alcanzados por Navarro (2013) apoyan los de este trabajo. Este autor también obtuvo los mejores resultados en medio de cultivo en estado semisólido, los cuales fueron superiores al medio de cultivo líquido, donde empleó 6-BAP a 4.3 mg l^{-1} y con coeficientes de multiplicación de 7.0 y 11.4 en el tercer y cuarto subcultivos respectivamente.

El medio de cultivo en estado semisólido presenta un mayor potencial matricial, disminuye la tasa de difusión de moléculas a

través del medio de cultivo y regula la disponibilidad de nutrientes a la planta (Krikorian, 2001; Cabrera *et al.*, 2010). Tradicionalmente en el cultivo de la malanga como sucede con la mayoría de las especies que se multiplican *in vitro* se ha empleado el medio de cultivo en estado semisólido y se obtiene un adecuado crecimiento y multiplicación de los explantes lo cual se corroboró con los resultados de tres subcultivos para la multiplicación del clon de malanga 'INIVIT MC-2001'

Aunque, el empleo del medio de cultivo líquido estático durante la fase de multiplicación provocó afectaciones en cuanto al crecimiento y brotación de las yemas axilares y limitó el coeficiente de multiplicación, es necesario buscar alternativas para su empleo con el objetivo de facilitar el manejo del material vegetal, disminuir los costos en la propagación *in vitro* e incrementar la eficiencia en los protocolos de micropropagación de plantas.

CONCLUSIONES

El tipo y concentración de reguladores de crecimiento así como el estado físico del medio de cultivo influyó en el coeficiente de multiplicación de los explantes de malanga. Con el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS con 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP y en estado semisólido se obtuvieron los mejores resultados.

REFERENCIAS

- Cabrera, D, J González, O Portal, R Hernández (2010) Influencia del virus del Mosaico de la malanga sobre el contenido de clorofila en *Xanthosoma nigrum* (VELL.) genotipo INIVIT M 95-1. Rev. Protección Veg. 25(3): 194-196
- 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
- Gálvez Diosdada, Manuel Cabrera Jova, Yoel Beovides García, Ania Robaina Jiménez, Sergio Rodríguez Morales, Daniel Rodríguez Pérez (2013) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del clon de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001'. Biotecnología vegetal 13(2): 107-112
- 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. En: 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, pp. 167-169. IBP. Santa Clara
- Gómez L, Saborío F, Salazar I, Arias O, Thorpe T (1991) Establecimiento y multiplicación *in vitro* de cuatro genotipos de ñampi (*Colocasia esculenta* var. 'Antiquorum'). Agronomía costarricense 15 (2): 123-128
- Hussain Z, R K Tyagi (2006) *In vitro* corm induction and genetic stability of regenerated plants in taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) Indian Journal of Biotechnology 5: 535-542
- Krikorian A (2001) Medios de cultivos: generalización, composición y preparación. En: Roca W, L Mroginski (Eds.) Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones, pp. 41-79. CIAT. Cali
- Matehus J, Romay G, Santana MA (2006) Multiplicación *in vitro* de Ocumo y Taro. Agronomía Tropical 56 (4): 607-613
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
- Navarro, MP (2013) Evaluación de medio líquido y semisólido en la micropropagación de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott). Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Honduras, Zamorano. Honduras
- 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, 31 Agosto- 8 Septiembre. Quito
- Verma VM, Cho JJ (2010) Plantlet development through somatic embryogenesis and organogenesis in plant cell cultures of *Colocasia esculenta* (L.) Schott. AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol. 18 (1): 167-170
- Vilchez J, Rivas Y, Albany N, Molina M, Martínez L (2009) Effect of the 6-benzylaminopurine on *in vitro* multiplicación of Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). Proyecto autofinanciado. Consejo de Desarrollo Científico y Humanitario. Zulia

Recibido: 10-5-2013

Aceptado: 3-9-2013