

Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca

Aymé Rayas*, V. Mederos, Magaly García, J. López, M. Cabrera, J. Ventura, Marilín Martínez, Valentina Gutiérrez, M. Álvarez, Maricel Bauta. *Autor para correspondencia.

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Apdo. 6, Santo Domingo, CP. 53000 Villa Clara. e-mail: inivit@ip.etcса.сu

RESUMEN

El cultivo de tejidos vegetales constituye una alternativa para la conservación del germoplasma de especies que son propagadas vegetativamente. Su utilización permite mantener las colecciones en pequeños espacios, libres del ataque de enfermedades y catástrofes, además de facilitar el intercambio de germoplasma. Se estudiaron 11 variantes del medio de cultivo MS que consistieron en diferentes concentraciones de sacarosa (20, 30 y 40 g.l⁻¹) y de manitol (0, 10, 20 y 30 g.l⁻¹), con el objetivo de disminuir el número de subcultivos en la conservación *in vitro* de los clones Señorita y CEMSA 74-725. Las evaluaciones se realizaron a los nueve meses de la implantación *in vitro*, teniendo en cuenta: altura (cm), número de entrenudos por planta, número de hojas activas, número de raíces activas y porcentaje de supervivencia. Los explantes que sobrevivieron, después de la conservación fueron incubados para su recuperación en el medio de cultivo descrito para el crecimiento *in vitro* de la yuca. El medio de cultivo suplementado con 40 g.l⁻¹ de sacarosa, 0.02 mg.l⁻¹ de BAP, 0.1 mg.l⁻¹ de GA₃ y 0.01 mg.l⁻¹ de ANA, resultó la mejor variante para la conservación *in vitro* de ambos clones.

Palabras clave: *Manihot esculenta*, micropropagación, recursos genéticos

ABSTRACT

Plant tissue culture constitutes an alternative for germplasm conservation in case of vegetatively propagated species. This approach permits to maintain collections in small places free from attack of diseases and catastrophes. Eleven variants from MS culture media were tested. Variants consist of different sucrose (20, 30 and 40 g.l⁻¹) and manitol (0, 10, 20 y 30 g.l⁻¹) concentrations in order to decrease the subculture number in the *in vitro* storage of 'Señorita' and 'CEMSA 74-725' clones. Evaluations were carried out nine months after *in vitro* implantation based on: height (cm), internode number by plant, number of active leaf, number of active roots and surviving percentage. After storage, explants were incubated for recovery in the described culture medium for *in vitro* cassava growing. A culture medium with the addition of 40 g.l⁻¹ sucrose, 0.02 mg.l⁻¹ BAP, 0.1 mg.l⁻¹ GA₃ and 0.01 mg.l⁻¹ ANA is recommended.

Key Words: *Manihot esculenta*, micropropagation, genetics resources

Para lograr un incremento de la productividad de los cultivos sin degradación de la base de los recursos del agroecosistema es necesario un acceso continuo a la mayor variabilidad genética posible disponible para un cultivo y las especies silvestres relacionadas con él.

Para conservar *ex situ* germoplasma de raíces y tubérculos, plátanos y bananos se utilizan diversos métodos según las condiciones ambientales y los medios y conocimientos disponibles. En el caso de los cultivos de propagación vegetativa es conveniente utilizar una combinación de técnicas de almacenamiento en lugar de depender de una sola. Entre las técnicas más utilizadas figuran los bancos de genes conservados en el campo, los de genes en semillas, los de genes *in vitro* y la crioconservación (Roca, 1994).

El cultivo de tejidos vegetales constituye una alternativa para la conservación del germoplasma de especies que son propagadas vegetativamente. Su utilización permite mantener las colecciones en pequeños espacios, libres

del ataque de enfermedades y catástrofes, además de facilitar el intercambio de germoplasma. El tejido empleado para la conservación *in vitro* debe permitir tanto el establecimiento, la regeneración de plantas en un amplio rango de genotipos y una alta estabilidad genética. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca.

Se utilizaron como explantes meristemos apicales con uno o dos primordios foliares, los cuales fueron desinfectados con Hipoclorito de Sodio 2,5% durante 10 minutos de los clones Señorita y CEMSA 74-725 según la metodología descrita por Medero (1995). Posteriormente se tomaron para su conservación segmentos nodales de plántulas establecidas *in vitro*. Se estudiaron variantes del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 0.02 mg.l⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (BAP), 0.1 mg.l⁻¹ de Acido Giberélico (GA₃) y 0.01 mg.l⁻¹ de Acido Naftalen acético (ANA) y diferentes concentraciones de sacarosa (20, 30 y 40 g.l⁻¹) y de manitol (0, 10, 20 y 30 g.l⁻¹). Se utilizó como control el medio de cultivo

descrito por CIAT (1993) para la conservación *in vitro* de la yuca. Se utilizaron 10 explantes por tratamiento y tres repeticiones.

Tratamientos:

Control	20 g.l ⁻¹ sacarosa.
1.	20 g.l ⁻¹ sacarosa +10 g.l ⁻¹ Manitol
2.	20 g.l ⁻¹ sacarosa +20 g.l ⁻¹ Manitol
3.	20 g.l ⁻¹ sacarosa +30 g.l ⁻¹ Manitol
4.	30 g.l ⁻¹ sacarosa
5.	30 g.l ⁻¹ sacarosa +10 g.l ⁻¹ Manitol
6.	30 g.l ⁻¹ sacarosa +20 g.l ⁻¹ Manitol
7.	30 g.l ⁻¹ sacarosa +30 g.l ⁻¹ Manitol
8.	40 g.l ⁻¹ sacarosa
9.	40 g.l ⁻¹ sacarosa +10 g.l ⁻¹ Manitol
10.	40 g.l ⁻¹ sacarosa +20 g.l ⁻¹ Manitol
11.	40 g.l ⁻¹ sacarosa +30 g.l ⁻¹ Manitol

Las evaluaciones se realizaron a los nueve meses de la implantación, teniendo en cuenta: altura (cm), número de entrenudos por planta, número de hojas activas, número de raíces activas y porcentaje de supervivencia.

Después de la conservación los explantes fueron transferidos, para su recuperación al medio de cultivo de crecimiento descrito por Roca (1994).

En las tablas 1 y 2 se muestra el efecto de las diferentes variantes del medio de cultivo basal MS sobre la conservación *in vitro* de los genotipos estudiados a los nueve meses de incubados.

Para el clon Señorita (Tabla 1) se observó que al utilizar en el medio de cultivo 20 g.l⁻¹ de sacarosa (tratamientos 1, 2 y 3), independientemente de la concentración de manitol, el porcentaje de recuperación de las plántulas fue del 78.8 al 87.7%. Por el contrario se evidenció que los mejores resultados de la recuperación de los explantes se obtuvieron a medida que se incrementó el contenido de sacarosa en el medio de cultivo, en orden ascendente le siguió el medio de cultivo suplementado con 30 g.l⁻¹ sin manitol (95.7%) (Tratamiento 4) y luego cuando se elevó el contenido de sacarosa a 40 g.l⁻¹ (Tratamiento 8) se lograron los mejores resultados con 97.7%.

Tabla 1. Resultados de las evaluaciones realizadas a los nueve meses de conservación *in vitro* de yuca, clon 'Señorita', en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas activas	Número de raíces activas	Porcentaje de supervivencia	Porcentaje de recuperación
Control	2.96 b	2.63 a	1.27 bc	100	87.7
1	1.68 cd	0.18 bc	0.45 cd	100	82.1
2	1.81 cd	0.00 c	0.27 d	83.3	82.6
3	2.04 bcd	0.90 bc	1.18 bcd	100	78.8
4	5.38 a	4.18 a	5.36 a	100	95.7
5	2.40 bc	0.90 bc	1.81 b	100	90.2
6	1.90 bcd	0.63 bc	1.90 b	100	90.9
7	1.54 cde	0.00 c	0.54 cd	100	92.9
8	4.86 a	3.72 a	3.63 a	100	97.7
9	6.04 a	4.00 a	4.90 a	100	93.7
10	1.27 de	1.00 b	1.72 b	100	91.7
11	0.77 e	0.36 bc	0.81 bcd	100	93.7
ES ±	0.13**	0.15**	0.21**		
CV (%)	25	31	31		

Por los resultados obtenidos en las diferentes combinaciones de medios de cultivo estudiadas para el clon Señorita su conservación *in vitro* fue favorecida por el incremento de la concentración de sacarosa hasta 40 g.l⁻¹ y no por el uso de manitol a las concentraciones utilizadas en el experimento. Con respecto al resto de las variables estudiadas se pudo constatar que los mejores resultados correspondieron también con los tratamientos cuatro, ocho y nueve sin diferencias entre ellos y si con el resto. El manitol redujo el crecimiento de las vitroplantas, aunque se observó una afectación en la recuperación del material

conservado, coincidiendo con Bhat y Chandel (1993) quienes plantearon que el uso de esta sustancia osmótica tenía efectos deletéreos.

En el clon CEMSA 74-725 (Tabla 2) se obtuvo un comportamiento similar al clon Señorita, a medida que se incrementó el contenido de sacarosa en el medio de cultivo se obtuvieron mejores resultados. La mejor recuperación de los explantes se alcanzó igualmente con los tratamientos cuatro, ocho y nueve con valores de 96.7% para el primer medio de cultivo seguido por 96.5% de recuperación para los dos restantes.

Tabla 2. Resultados de las evaluaciones realizadas a los nueve meses de conservación *in vitro* de yuca, clon CEMSA 74-725, en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Altura (cm)	# de hojas activas	# raíces activas	% de supervivencia	% de recuperación
Control	1.75 c	1.83 cd	0.91	100	80.0
1	1.72 c	1.25 d	0.28	100	86.2
2	1.73 c	0.58 d	0.33	100	78.5
3	1.66 c	0.25 cd	0.66	100	92.5
4	4.62 b	3.16 ab	8.00	100	96.7
5	2.62 c	0.91 cd	2.00	91.6	90.7
6	2.25 c	0.68 cd	0.75	100	80.0
7	2.29 c	0.33 cd	0.58	100	87.5
8	6.04 a	4.16 a	10.58	100	96.6
9	3.70 b	1.75 b	6.08	100	96.5
10	1.83 c	1.66 c	2.33	100	86.4
11	1.66 c	0.50 d	1.75	100	90.6
ES ±	0.09	0.11	0.22		
CV =	19 %	31 %	47%		

En el caso de las variables altura, número de hojas activas y número de raíces activas se observó que los medios de cultivo de los tratamientos cuatro, ocho y nueve mostraron superioridad al resto de los tratamientos estudiados.

No se detectaron diferencias estadísticas entre los porcentajes de recuperación de vitroplantas en los dos clones estudiados; pues el estadígrafo de comparación ($\chi^2=2.29$ y 2.98 respectivamente) resultó no significativo en el procedimiento empleado (Kruskal-Wallis).

De forma general según los resultados obtenidos para la conservación *in vitro* de estos clones el medio de cultivo suplementado con 40 g.l^{-1} de sacarosa y sin manitol fue el de mejor comportamiento y se recomienda su utilización.

REFERENCIAS

- Bhat, SR y KPS Chandel (1993). *In vitro* conservación of *Musa* germplasm: effects of manitol and temperature on growth and storage. *Journal of Horticultural Science* 68: 841-845
- CIAT (1993) Annual Report. pp. 34-39
- Murashige, T y Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Medero, V (1995) Regeneración por embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta*, Crantz.).— 50p. Tesis (Master of Science) Instituto de Biotecnología de las Plantas en la UCLV. Santa Clara
- Roca, W (1994). Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, 63p.