

Efecto de 6-BAP y AIA en el establecimiento *in vitro* de meristemos de *Colocasia esculenta* (L.) Schott cv. 'INIVIT MC 2012'

Arletys Santos Pino, Jorge López Torres, Milagros Basail Pérez, Yenisey Gutiérrez Sánchez, Aymé Rayas Cabrera, Víctor Medero Vega, Dayana Rodríguez González, Daniel Rodríguez Pérez, Yoel Beovides García, Damicela Reinaldo Álvarez, Maricel Bauta Toledo

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6. Santo Domingo. Villa Clara. Cuba. CP 53 000.
e-mail: organog.biotec@inivit.cu

RESUMEN

El empleo de meristemos para el establecimiento *in vitro* de *Colocasia esculenta* (L.) Schott cv. 'INIVIT MC-2012' disminuye la contaminación bacteriana pero se requiere incrementar su crecimiento. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de 6-Bencilaminopurina y ácido indolacético en su establecimiento *in vitro*. Se incluyeron varias concentraciones de los dos reguladores del crecimiento en el medio de cultivo y con la mejor combinación se cultivaron los explantes en medio de cultivo líquido en agitación y estático. Con el empleo el medio de cultivo constituido por el 80% de las sales y vitaminas MS, 30 g l⁻¹ de sacarosa, 0.1 g l⁻¹ de mio-inositol, 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP, 0.05 mg l⁻¹ de AIA y cultivo en agitación se lograron meristemos con las características morfológicas adecuadas para pasar a la fase de multiplicación a los 28 días de cultivo.

Palabras clave: agitador orbital, malanga, propagación

Effect of 6-BAP and IAA in meristems *in vitro* establishment of *Colocasia esculenta* (L) Schott 'INIVIT MC 2012' cultivar

ABSTRACT

The use of meristems for the *in vitro* establishment of *Colocasia esculenta* (L.) Schott cv. 'INIVIT MC-2012' decreases bacterial contamination but is required to increase its growth. The objective of this work was to determine the effect of 6-Benzylaminopurine and indoleacetic acid on its *in vitro* establishment. Various concentrations of the two growth regulators were included in the culture medium and with the best combination the explants were cultured in shaking and static liquid culture medium. With the use of the culture medium constituted by 80% of the salts and vitamins MS, 30 g l⁻¹ sucrose, 0.1 g l⁻¹ myo-inositol, 0.1 mg l⁻¹ 6-BAP, 0.05 mg l⁻¹ of IAA and culture in agitation were obtained meristems with the appropriate morphological characteristics to transfer to the multiplication phase at 28 days of culture.

Keywords: orbital agitator, propagation, taro

INTRODUCCIÓN

El cultivar de malanga 'INIVIT MC-2012' presenta un rendimiento potencial de 36 t ha⁻¹. Es poco afectado por las pudriciones secas (Espinosa *et al.*, 2012). Durante su cocción se ablanda completamente y posee excelente calidad culinaria. Su ciclo de cosecha es de nueve a doce meses. Por ello, se trabaja en su propagación *in vitro* en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) (Medero, 2016).

Los protocolos para el establecimiento *in vitro* de malanga (*Colocasia* o *Xanthosoma*), generalmente emplean como material vegetal yemas axilares o ápices meristemáticos,

(García *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 2013).

Entre los principales problemas para el establecimiento *in vitro* de este cultivo está la contaminación causada por bacterias (Carrazana *et al.*, 2011; Hossain, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2015). Santos *et al.* (2015) demostraron que el empleo de meristemos como explante inicial, disminuye las pérdidas por contaminación bacteriana en el establecimiento *in vitro* de malanga 'INIVIT MC-2012'. Sin embargo, se requiere incrementar el crecimiento de los meristemos para pasar a la fase de multiplicación. Atendiendo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la concentración de

6-Bencilamino Purina (6-BAP) y ácido indolacético (AIA), en el establecimiento *in vitro* de malanga cv. 'INIVIT MC 2012' (*Colocasia esculenta* Schott).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó el cultivar de malanga 'INIVIT MC-2012' procedente del Banco de Germoplasma del INIVIT. Como explante se utilizaron meristemos de 0.6 mm.

Influencia de la concentración de 6-BAP y AIA

Para la extracción de meristemos se empleó el protocolo descrito por Santos *et al.* (2015). El establecimiento se realizó en el medio de cultivo líquido constituido por el 80% de las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 0.1 g l⁻¹ de mio-inositol, el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH (0.5 N) y/o HCl (0.5 N) antes de la esterilización en autoclave.

Los tratamientos consistieron en las combinaciones de concentraciones de reguladores de crecimiento que se muestran en la tabla 1.

Se establecieron *in vitro* 15 explantes por cada tratamiento. Se colocó un explante por tubo de ensayo. Los tubos se colocaron en cámara de crecimiento a 25±2.0°C e iluminación artificial mediante tubos fluorescentes, fotoperíodo de 16 horas luz y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 42.0-48.0 μmol m⁻² s⁻¹.

A los 28 días se cuantificó el número de explantes que presentaban al menos una hoja expandida y se midió el grosor (cm). Con estas dos variables se seleccionó el medio de cultivo donde se obtuvieron los mejores resultados y se evaluó el desarrollo de los meristemos en medio de cultivo en agitación (60 r.p.m) y estático. Se establecieron *in vitro* 30 meristemos por cada tratamiento. A los 28 días se midió la longitud (cm) del explante desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja.

Análisis estadísticos

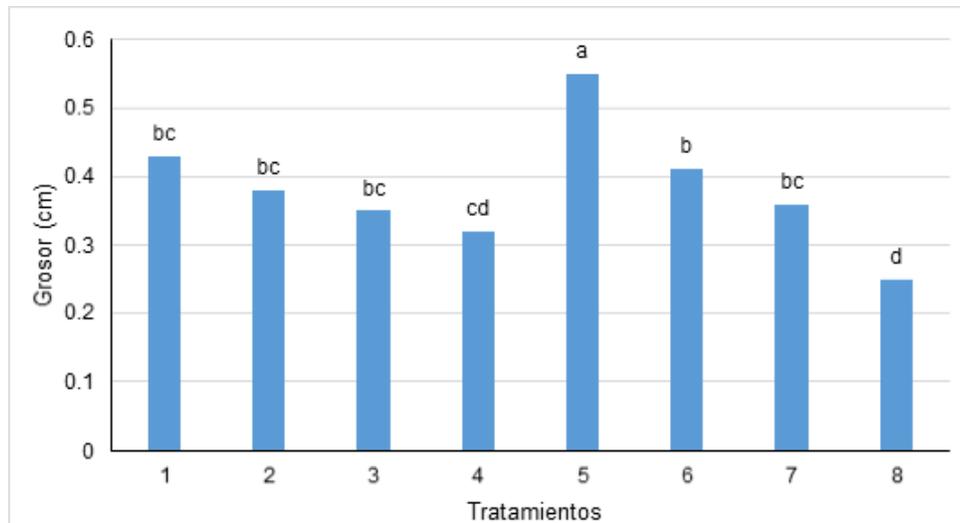
Se empleó un diseño completamente al azar. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el software SPSS versión 15.0. Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Los datos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple y la comparación múltiple de medias se realizó según Tukey con un nivel de significación de p<0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de 6-BAP y AIA en el medio de cultivo, influyó en el crecimiento de los meristemos de malanga durante la fase de establecimiento *in vitro*. Cuando se incrementó la concentración de 6-BAP, desde 0.1 mg l⁻¹ hasta 2.0 mg l⁻¹, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para el grosor de los explantes. Sin embargo, con 0.1

Tabla 1. Combinaciones de reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo de establecimiento *in vitro* de malanga.

Tratamiento	6-BAP (mg l ⁻¹)	AIA (mg l ⁻¹)
1	0.1	0
2	0.5	0
3	1.0	0
4	2.0	0
5	0.1	0.05
6	0.5	0.05
7	1.0	0.05
8	2.0	0.05



Letras sobre barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey para $p < 0.05$

Figura 1. Efecto de la concentración de 6-BAP y AIA en el grosor de los explantes en el establecimiento *in vitro* de malanga cv. 'INIVIT MC 2012' (*Colocasia esculenta* Schott) a los 28 días de cultivo. Leyenda: 1. 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP, 2. 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP, 3. 1.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 4. 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 5. 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP+0.05 mg l⁻¹ de AIA, 6. 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP+0.05 mg l⁻¹ de AIA, 7. 1.0 mg l⁻¹ de 6-BAP+0.05 mg l⁻¹ de AIA, 8. 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP +0.05 mg l⁻¹ de AIA.

mg l⁻¹ de 6-BAP y 0.05 mg l⁻¹ de AIA (tratamiento 5) se logró el mayor grosor de los explantes (0.55 cm) con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Figura 1). Generalmente, cuando se emplean ápices para el establecimiento *in vitro* de los cultivos no se adicionan auxinas al medio de cultivo, aunque estas pueden estimular el crecimiento, pero en los meristemos y en yemas en reposo es frecuente que no exista suficiente auxina endógena, siendo necesaria su adición cuando éstos se utilizan como explante (Jiménez, 1998).

Resultados similares fueron obtenidos por Chien *et al.* (2008) en la micropropagación de malanga blanca (*Colocasia esculenta*). Estos autores utilizaron el medio de cultivo MS con 5 mg l⁻¹ de 6-BAP y la adición de 1 mg l⁻¹ de AIA para el establecimiento *in vitro* de meristemos y lograron que tomaran color verde después de una semana de cultivo. De forma general, en cultivo *in vitro* de los ápices de malanga se han empleado concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo de establecimiento que varían desde 0.1 hasta 2.0 mg l⁻¹ (Dottin, 2000; Rodríguez *et al.*, 2009). 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. De igual forma, en el establecimiento

in vitro de *Philodendron*, Blanco y Valverde (2004) obtuvieron un mejor desarrollo de los explantes cuando utilizaron concentraciones de 0.8 mg l⁻¹ de 6-BAP y 2.0 mg l⁻¹ de AIA.

Los explantes colocados en el agitador orbital a 60 r.p.m., incrementaron significativamente su longitud (0.97cm, $p \leq 0.05$) con respecto a los que se cultivaron en medio de cultivo líquido estático (0.53 cm). Los meristemos que se establecieron en el medio de cultivo en agitación se caracterizaron por un mejor crecimiento, coloración verde y hojas más desarrolladas, a diferencia de los que se encontraban en el medio de cultivo estático, que presentaron un crecimiento más lento, una coloración verde claro y hojas sin abrir a los 28 días de cultivo.

CONCLUSIONES

El cultivo con 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP y 0.05 mg l⁻¹ de AIA en agitación incrementan el crecimiento de meristemos de malanga 'INIVIT MC 2012' en el establecimiento *in vitro*.

REFERENCIAS

Carrazana D, Santos A, Alderete Y, Gálvez D, Cupull R, Navarro M (2011) Bacteria endófitas latentes no vitropatógenas en el cultivo *in vitro* de *Xanthosoma sagittifolium* (L.). Centro Agrícola 38(4): 21-29

- Chien YK, Kung JP, Donald R (2008) *In vitro* micropropagation of white dasheen (*Colocasia 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 Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Espinosa E, Herrera L, Dávila A, Espinosa A, Figueroa Y, Armario D, Pérez D, Aguiar J, Chamizo M (2012) Efecto del material vegetal de plantación sobre la incidencia de pudriciones secas en *Colocasia esculenta* (L.) Schott y *Xanthosoma* spp. Biotecnología Vegetal 12 (4): 235 – 244
- Gálvez D, Cabrera M, Beovides Y, Robaina A, Rodríguez S, Rodríguez D (2013) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del cultivar 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, Gonzáles 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: Alvarado-Capó Y, Gregorio O (eds). 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, Santa Clara, 16-19/junio/1999, pp. 167-169. IBP, Santa Clara; ISBN: 959-7122-03-0
- Gutiérrez Y, Torres Y, Robaina A, Bauta M, Rayas A, Santos A, Basail M, López J, Mederos V, Beovides Y, Rodríguez D (2015) Incidencia de contaminantes microbianos en la propagación *in vitro* de *Xanthosoma* spp. clon 'INIVIT MX-2007' y *Colocasia esculenta* (L.) Schott. clon 'INIVIT MC-2012'. Biotecnología Vegetal 15(3): 157-161
- Hossain M (2012) *In vitro* organogenesis of *Colocasia esculenta* cv. Antiquorum L. American Journal of Plant Sciences 3(6):709-713; doi: 10.4236/ajps.2012.36085
- Jiménez E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez Ponce JN (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 45-56. IBP, Santa Clara; ISBN: 959-7122-02-2
- Medero V, Rodríguez S, Basail M, Santos A, Rayas A, López J, Beovides Y, Rodríguez D, Torres M, Robaina A, Caballero W, Cruz J, Bravo Y, Pons C, Medero M (2016) 'INIVIT MC-2012': Nuevo clon de malanga *Colocasia* desarrollado por técnicas biotecnológicas. En: INCA (ed). XX Congreso Científico Internacional, San José, 23-25/11/2016, pp.1-5. Ediciones INCA, San José; ISBN 978-959-7023-89-0
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Rodríguez A, Quintero S, Rodríguez AJ, Fundora Z (2003) Establecimiento *in vitro* de ápices de malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). Cultivos Tropicales 24(3): 19-22
- Rodríguez A, Rodríguez A, Quintero S (2009) Caracterización de germoplasma y mejoramiento participativo en especies de raíces y tubérculos alimenticios tropicales y en musáceas. En: CIAT (ed). Simposio Internacional y Taller de Fitomejoramiento Participativo en América Latina y el Caribe, Quito, 31-08/09/2009; pp. 01-13; CIAT, Cali; ISBN: 958-694-031-4
- Santos A, Reinaldo D, López J, Basail M, Medero V, Gutiérrez Y, Rayas A, Beovides Y, Bauta M (2015) Incremento de la eficiencia en el establecimiento *in vitro* de la malanga 'INIVIT MC-2012' (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.). Rev Agricultura Tropical 1 (1): 70-74

Recibido: 25-02-2016
Aceptado: 12-07-2016