

## Protocolo para la propagación *in vitro* de *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'

Yenisey Gutierrez<sup>1</sup>, Maryluz Folgueras<sup>1</sup>, Arletys Santos<sup>1</sup>, Jorge López<sup>1</sup>, Damicela Reinaldo<sup>1</sup>, Marisel Bauta<sup>1</sup>, Greisy López<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Apdo 6. Santo Domingo. Villa Clara. Cuba. CP 53 100. e-mail: contam.biotec@inivit.cu

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: yelenys@ibp.co.cu

### RESUMEN

El establecimiento *in vitro* de malanga (*Xanthosoma* y *Colocasia*) a partir de material vegetal procedente de campo ha sido una de las vías para iniciar su propagación *in vitro*. Para ello se han empleado diferentes tipos de explantes y métodos. Este trabajo persiguió como objetivo presentar un protocolo para la propagación *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'. Se incluyen procedimientos para el establecimiento *in vitro* a partir de yemas axilares de rizomas primarios de plantas cultivadas en campo y de yemas axilares de plantas propagadas en campo que se modificaron para disminuir el impacto de la contaminación bacteriana. Además, se presenta un procedimiento para la detección visual de contaminantes bacterianos y alternativas para la propagación *in vitro* de este cultivar.

Palabras clave: contaminación bacteriana, malanga, meristemas

### Protocol for *in vitro* propagation of *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'

#### ABSTRACT

The *in vitro* establishment of malanga (*Xanthosoma* and *Colocasia*) from plant material cultivated in the field has been one of the ways to initiate the *in vitro* propagation. For this purpose different types of explants and methods have been used. The objective of this work was to present a protocol for the *in vitro* propagation of *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'. Procedures are included for *in vitro* establishment from axillary buds of primary rhizomes of field-grown plants and axillary buds from field propagated plants that were modified to decrease the impact of bacterial contamination. In addition, a procedure for the visual detection of bacterial contaminants and alternatives for the *in vitro* propagation of this cultivar is presented.

Keywords: bacterial contamination, taro, meristems

#### INTRODUCCIÓN

El establecimiento *in vitro* de malanga (*Xanthosoma* y *Colocasia*) a partir de material vegetal procedente de campo ha sido una de las vías para iniciar su propagación *in vitro*.

García *et al.* (1999) propusieron el empleo de yemas axilares de rizomas primarios de plantas cultivadas en campo de los cuales posteriormente se extraen meristemas. También como alternativa, Gálvez *et al.* (2013) refirieron el establecimiento *in vitro* de malanga cv. 'INIVIT MC-2001' a partir de

yemas axilares de plantas propagadas en campo. Además, se cuenta con una norma ramal (NRAG 205:11) para la propagación de este cultivo (NRAG, 2011).

Varias modificaciones de ambos métodos han sido realizadas para la propagación de diferentes cultivares. En este sentido, el cultivar 'INIVIT MC-2012', ha sido objeto de estudio y se han ensayado diferentes tipos de explantes (Santos *et al.*, 2015), medios de cultivo (Santos *et al.*, 2017), además de la aplicación práctica de otros aspectos desarrollados para diferentes cultivares. Sin

embargo, no se cuenta con un documento que los integre.

Por otra parte, en la propagación *in vitro* de malanga (*Xanthosoma* y *Colocasia*) varios autores han descrito la presencia de contaminantes bacterianos que limitan su propagación a escala comercial (Carrazana *et al.*, 2011; Vilchez *et al.*, 2011). El cultivar 'INIVIT MC-2012' no es una excepción y se ha observado una alta incidencia de dichos contaminantes (Gutierrez *et al.*, 2015).

Una de las estrategias para el manejo de los contaminantes microbianos incluye la aplicación de métodos de detección temprana (Alvarado-Capó, 2003). Para el cultivo *in vitro* de malanga, autores como García *et al.* (1999) propusieron el uso del método de siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológico con el empleo de secciones de la parte basal (González *et al.*, 1997) y Santos *et al.* (2005) emplearon agua de coco y extracto de levadura en el medio de cultivo de las plantas para similar fin. No obstante, existen diversos criterios a la hora de hacer la detección visual de contaminantes bacterianos de forma rutinaria en la propagación *in vitro* de este cultivo.

Para reunir en un solo documento todo lo relativo a la propagación *in vitro* de este cultivar mediante los métodos propuestos, los cuales se modificaron para disminuir el impacto de la contaminación bacteriana, se presenta el siguiente protocolo. Se incluye además, un procedimiento para la detección visual de contaminantes bacterianos.

## PROCEDIMIENTOS

### I. Detección visual de contaminantes bacterianos en la propagación *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'

#### Materiales

##### *Material vegetal*

- Meristemas o yemas axilares establecidos *in vitro*, plantas *in vitro* en fase de multiplicación o enraizamiento.

##### *Otros materiales*

- Agua destilada estéril
- Cubreobjetos
- Lámpara fluorescente
- Portaobjetos

#### Equipos e instrumental

- Microscopio óptico

#### Precauciones y medidas de seguridad

Evitar el contacto directo de la piel o mucosas con los cultivos microbianos. Emplear guantes. Lavarse las manos al concluir el ensayo. Descontaminar los recipientes de cultivo contaminados en autoclave durante al menos 40 minutos y lavarlos separados de los no contaminados.

#### Procedimiento

- Colocar los recipientes de cultivo contra una lámpara fluorescente y observar cambios de color, transparencia o consistencia en el medio de cultivo o crecimiento microbiano sobre el medio de cultivo.

- En la fase de establecimiento *in vitro* comparar el recipiente de cultivo (tubo de ensayo) con medio de cultivo líquido y explante con uno similar sin explante. Detectar la presencia de turbidez, sedimento o mucosidad. Se puede colocar por detrás del recipiente a la altura del medio de cultivo un aditamento metálico fino (por ejemplo, alambre de un asa de siembra) que facilite la comparación.

- En las fases de multiplicación y enraizamiento *in vitro* detectar la presencia de opacidad o halos debajo de la base del explante o crecimiento sobre el medio de cultivo (Figura 1).

- Descartar los recipientes de cultivo con presencia de turbidez, opacidad, cambio de color, halos debajo de la base del explante o crecimiento sobre el medio de cultivo.

- Comprobar la presencia de contaminantes bacterianos por observación directa en el microscopio óptico (400 y 1000x) en preparaciones frescas con agua destilada estéril.

- Hacer registro de número de explantes contaminados por línea y subcultivo. Registrar también la presencia de otros grupos microbianos (hongos filamentosos o levaduras). Calcular el porcentaje de contaminación por línea y subcultivo con respecto al número inicial de explantes en el subcultivo que se trate.

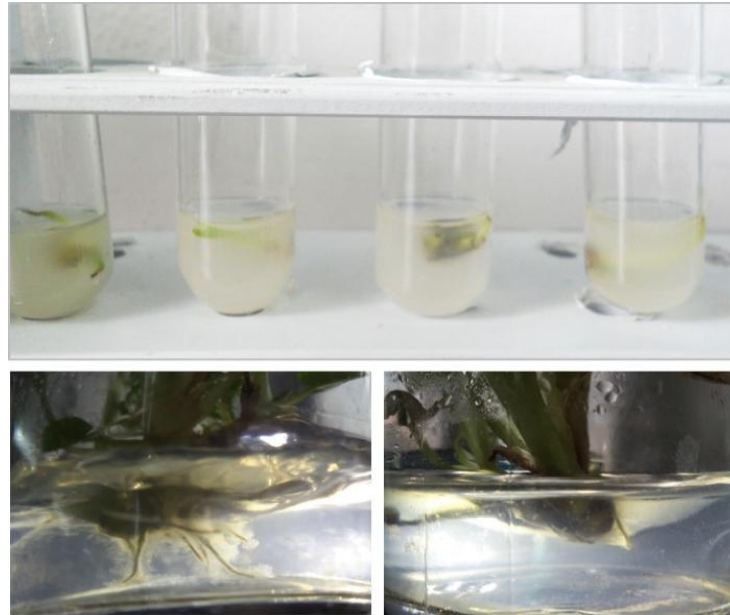


Figura 1. Contaminación bacteriana en la propagación *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'. Arriba: presencia de turbidez en el medio de cultivo. Abajo: crecimiento debajo del explante con opacidad y formación de halos en el medio de cultivo.

II. Establecimiento *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' mediante el método propuesto por García *et al.* (1999) modificado

#### Materiales

##### Material vegetal

- Rizomas primarios de plantas crecidas durante 12 meses en campo, con las características típicas del cultivar y adecuado desarrollo, que no presenten síntomas de enfermedades ni presencia de plagas. Rizomas primarios sin daños mecánicos, por insectos, ni síntomas de pudriciones secas, con masa fresca entre 400-500 g, cosechados después de al menos tres días sin lluvia o riego.

##### Medio de cultivo (líquido)

- 80% de las sales y vitaminas Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.1 mg l<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 0.1 g l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0.05 mg l<sup>-1</sup> de ácido indol acético (AIA), pH ajustado a 5.7 con NaOH 0.5 N y/o HCl 0.5 N antes de la esterilización en autoclave (García *et al.*, 1999 modificado por Santos *et al.*, 2017).

##### Otros materiales

- Agua corriente  
- Agua destilada estéril

- Cepillo de lavar  
- Detergente comercial  
- NaOCl  
- Recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos)  
- Tubos de ensayo (145.0 mm x 25.0 mm)  
- Vaso de precipitado de 500 o 1000 ml

##### Equipos e instrumental

- Aditamento metálico para extracción de yemas axilares  
- Bisturíes  
- Cabina de flujo laminar  
- Esterilizador eléctrico  
- Microscopio óptico  
- Pinzas

##### Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel y la inhalación de vapores de las soluciones de hipoclorito de sodio que pueden causar quemaduras e irritación, respectivamente.

### Procedimiento

- Cosechar rizomas primarios de plantas de 12 meses de cultivo con al menos tres días sin lluvia.
- Lavar con agua corriente y un cepillo para eliminar todo resto de suelo.
- Colocar en lugar fresco y seco, protegido de la luz directa del sol por 72 h.
- Seleccionar las yemas axilares más grandes y con ayuda de un aditamento metálico proceder a su extracción (Figura 2 a-d).
- Reducir el tamaño de las yemas hasta 1.0-2.0 cm mediante cortes longitudinales y transversales en los bordes de la base y eliminar el tejido que las recubre (Figura 2 e-g).
- Lavar tres veces con agua corriente y detergente comercial.
- Trasladar a cabina de flujo laminar y sumergir en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% (v/v), durante 20 minutos.
- Eliminar el desinfectante por decantación y enjuagar con agua desionizada estéril tres veces.
- Extraer meristemos (0.3-0.5 mm) o yemas (0.3-0.5 cm) con empleo de un microscopio estereoscópico con aumento de 100x y escala micrométrica auxiliar (Figura 2 h).
- Colocar los explantes (meristemos o yemas) de forma individual por cada tubo de ensayo (145.0 mm x 25.0 mm) con 10 ml de medio de cultivo líquido para establecimiento *in vitro* de *C. esculenta* (García *et al.*, 1999 modificado por Santos *et al.*, 2017).

- Identificar cada tubo de ensayo con un número que identificará la línea hasta el tercer subcultivo de multiplicación.
- Mantener por 18 días en cámara de crecimiento a  $26 \pm 2$  °C, con luz continua blanca fluorescente ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y fotoperíodo 16 horas luz.
- Realizar observación visual detallada contra una fuente de luz para detectar la presencia de contaminantes bacterianos en el medio de cultivo según *Protocolo para la detección visual de contaminantes bacterianos*. Descartar los explantes contaminados.
- Transferir a medio de cultivo fresco de igual composición y se colocaron por similar período en las mismas condiciones.

III. Establecimiento *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' mediante el método propuesto por Gálvez *et al.* (2013) modificado

### Materiales

#### Material vegetal

- Rizomas primarios de plantas crecidas durante 2-6 meses en campo o 2-6 meses en Casa de cultivo con las características típicas del cultivar y adecuado desarrollo, que no presenten síntomas de enfermedades ni presencia de plagas. Rizomas primarios sin daños mecánicos, por insectos, ni síntomas de pudriciones secas, cosechados después de al menos tres días sin lluvia o riego.



Figura 2. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' mediante el método propuesto por García *et al.* (1999) modificado. a-d, extracción de yemas. e-g, reducción del tamaño de las yemas. H, extracción de yemas axilares de 0.3-0.5 cm.

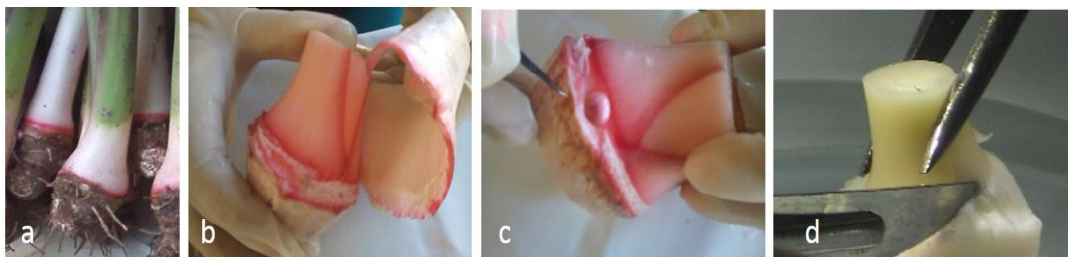


Figura 3. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' mediante el método propuesto por Gálvez *et al.* (2013) modificado. a, rizomas primarios de plantas jóvenes (2-6 meses de cultivo). B, eliminación de hojas externas. c-d, extracción de yemas.

#### Medio de cultivo (líquido)

- 80% de las sales y vitaminas Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.1 mg l<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 0.1 g l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0.05 mg l<sup>-1</sup> de ácido indol acético (AIA), pH ajustado a 5.7 con NaOH 0.5 N y/o HCl 0.5 N antes de la esterilización en autoclave (García *et al.*, 1999, modificado por Santos *et al.*, 2017).

#### Otros materiales

- Agua corriente
- Agua destilada estéril
- Cepillo de lavar
- Detergente comercial
- NaOCl
- Recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos)
- Tubos de ensayo (145.0 mm x 25.0 mm)
- Vaso de precipitado de 500 o 1000 ml

#### Equipos e instrumental

- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Microscopio óptico
- Pinzas

#### Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel y la inhalación de vapores de las soluciones de hipoclorito de sodio que pueden causar quemaduras e irritación, respectivamente.

#### Procedimiento

- Seleccionar rizomas primarios de plantas jóvenes (2-6 meses de cultivo).
- Eliminar sus hojas y raíces (Figura 3 a).
- Reducir su tamaño hasta 15 cm de altura (dejando 4 cm de diámetro y 5 cm de altura de tejido del rizoma) (Figura 3 b)
- Lavar tres veces con agua corriente y detergente comercial.
- Eliminar las hojas externas y extraer yemas axilares de 0.5-0.8 cm con la ayuda de un bisturí (Figura 3 c).
- Trasladar las yemas a cabina de flujo laminar y sumergir en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% (v/v), durante 15 minutos.
- Eliminar el desinfectante por decantación y enjuagar con agua desionizada estéril tres veces.
- Extraer meristemos (0.3-0.5 mm) y yemas (0.3-0.5 cm) con el empleo de un microscopio estereoscópico con aumento de 100x y escala micrométrica auxiliar (Figura 3 d).
- Colocar los explantes individuales (meristemos o yemas) en cada tubo de ensayo (145.0 mm x 25.0 mm) con 10 ml de medio de cultivo líquido para establecimiento *in vitro* de *C. esculenta* (García *et al.*, 1999, modificado por Santos *et al.*, 2017).
- Identificar cada tubo de ensayo con un número que identificará la línea hasta el tercer subcultivo de multiplicación.
- Mantener por 18 días en cámara de crecimiento a 26±2°C, con luz continua blanca fluorescente (150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y fotoperiodo 16 horas luz.
- Realizar observación visual detallada contra una fuente de luz para detectar la presencia de contaminantes bacterianos en el medio de cultivo según *Protocolo para la detección visual de contaminantes bacterianos*. Descartar los explantes contaminados.

- Transferir a medio de cultivo fresco de igual composición y colocar por similar periodo en las mismas condiciones.

#### IV. Multiplicación y el enraizamiento *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'

##### Materiales

###### *Material vegetal*

- Procedente de la fase de establecimiento para la fase de multiplicación: plantas *in vitro* libres de contaminantes microbianos visibles, con altura mayor de 8 mm, al menos una yema axilar que permita su posterior multiplicación y coloración verde.
- Procedente de la fase de multiplicación para la fase de enraizamiento: plantas *in vitro* libres de contaminantes microbianos visibles, con 20 - 30 mm de altura y de 2 - 3 hojas.

###### *Medios de cultivo*

- *Medio de cultivo semisólido para la multiplicación in vitro*: sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa; 3 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP; 1 mg l<sup>-1</sup> de ácido indol acético (AIA), 0.1 g l<sup>-1</sup> de mio-inositol, pH 5,7, solidificado con 6.5 g l<sup>-1</sup> de Agar E (BIOCEN) (García *et al.*, 1999).
- *Medio de cultivo semisólido para el enraizamiento in vitro*: 50% de las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), 15 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 mg l<sup>-1</sup> de ácido indol butírico (AIB), solidificado con 6.5 g l<sup>-1</sup> de Agar E (BIOCEN), pH 5.7 según García *et al.* (1999).

###### *Otros materiales:*

- Recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos)
- Tubos de ensayo (145.0 mm x 25.0 mm)

##### Equipos e instrumental

- Bisturios
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas

##### Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector

de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturios después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura.

##### Procedimiento

#### IV.1 Multiplicación

- Realizar observación visual detallada contra una fuente de luz fluorescente para detectar la presencia de contaminantes bacterianos en el medio de cultivo debajo de la base del explante según *Protocolo para la detección visual de contaminantes bacterianos* (I). Descartar los explantes contaminados.
- Extraer los explantes de los tubos de ensayo y colocar en recipiente para su manipulación (placa Petri, plato metálico). Manipular un tubo cada vez y mantener la numeración por líneas hasta el 3er subcultivo. Posteriormente, si se continúa la fase de multiplicación se pueden formar lotes con el material vegetal de varias líneas.
- Individualizar los brotes con la ayuda de pinzas y bisturios estériles.
- Eliminar de los explantes el tejido muerto, seco o fenolizado con cortes en la base y bordes laterales del explante.
- Decapitar los explantes, eliminar la parte foliar y cuidar no dañar el meristemo.
- Cambiar de juego de instrumental cada vez que se trabaje con un tubo nuevo.
- Transferir a medio de cultivo de multiplicación semisólido en tubos de ensayo (150.0 mm x 30.0 mm) con 15 ml de medio de cultivo y un explante por recipiente de cultivo.
- Colocar los explantes en cámara de crecimiento a 26±2 °C, con luz continua blanca fluorescente (150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y fotoperíodo 16 horas luz.
- Realizar observación visual detallada contra una fuente de luz para detectar la presencia de contaminantes bacterianos en el medio de cultivo debajo de la base del explante según *Protocolo para la detección visual de contaminantes bacterianos* (I). Descartar los explantes contaminados.
- Realizar subcultivos cada 18 días de forma similar a lo descrito anteriormente cuando los explantes deben tener varios brotes (Figura 4).





Figura 4. Explantes vivos (verdes y crecidos) en medio de cultivo de multiplicación semisólido listos para un nuevo subcultivo de multiplicación.

IV.2 Enraizamiento

- Realizar observación visual detallada contra una fuente de luz para detectar la presencia de contaminantes bacterianos en el medio de cultivo debajo de la base del explante según *Protocolo para la detección visual de contaminantes bacterianos (I)*. Descartar los explantes contaminados.
- Extraer los explantes de los recipientes de cultivo y colocar en recipiente para su manipulación (placa Petri, plato metálico). Manipular un recipiente cada vez.
- Eliminar de los explantes el tejido muerto, seco o fenolizado.
- Individualizar los brotes con la ayuda de pinzas y bisturíes estériles. Cambiar de

- juego de instrumental cada vez que se trabaje con un recipiente nuevo.
- Clasificar los explantes por altura (menores de 1 cm, de 1-2 cm y mayores de 2 cm).
- Transferir a medio de cultivo de enraizamiento semisólido.
- Colocar los explantes en cámara de crecimiento a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , con luz continua blanca fluorescente ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y fotoperíodo 16 horas luz durante 21 días.
- Transferir a la fase de aclimatización.

Consideraciones finales

A partir de los procedimientos anteriores se pueden conformar varias alternativas para la propagación *in vitro* de *C. esculenta* 'INIVIT MC-2012' (Figura 5).

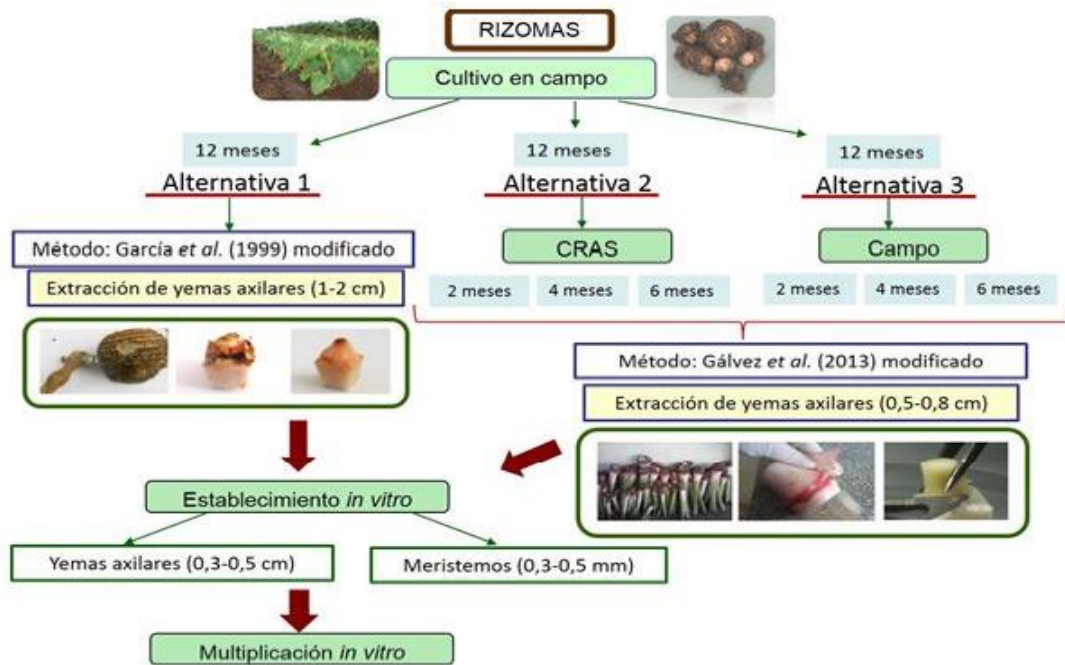


Figura 5. Alternativas para la propagación *in vitro* de malanga cv. 'INIVIT MC-2012' hasta la fase de multiplicación.

## CONCLUSIONES

La propagación de *C esculenta* cv. INIVIT-2012 a partir de materiales vegetal de campo puede efectuarse por dos procedimientos que reducen el tamaño del explante y contribuyen a disminuir la incidencia de contaminantes bacterianos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de la tesis de maestría 'Estrategia para el manejo de la contaminación bacteriana en la propagación *in vitro* de *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' del programa de maestría en Biotecnología vegetal del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

## REFERENCIAS

Alvarado-Capó Y (2003) Incidencia, identificación y estrategias para la prevención y el control de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara. Cuba

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. Schott). Centro Agrícola 38(4): 21-29

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, 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: 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

González R, Borrás O, Morales M (1997) Introducción de una metodología para el control de las contaminaciones en el cultivo de tejidos de plantas en biofábricas y laboratorios de investigaciones. BIOVEG'97 Centro de Bioplanta, Ciego de Ávila

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

NRAG (2011) NRAG 205: 11 Norma Ramal de la Agricultura, Biotecnología, Propagación *in vitro* de la malanga (*Colocasia esculenta* y *Xanthosoma* spp.): Especificaciones. MINAG, La Habana

Santos A, López J, Basail M, Gutiérrez Y, Rayas A, Medero V, Rodríguez D, Rodríguez D, Beovides Y, Reinaldo D, Bauta M (2017) Efecto de 6-BAP y AIA en el establecimiento *in vitro* de meristemos de *Colocasia esculenta* (L.) Schott cv. 'INIVIT MC 2012'. Biotecnología Vegetal 17(1): 67 – 70

Vilchez J, Albany N, Martínez L, Molina M, Alvarez C, Leal E, Bermúdez L (2011) Establecimiento *in vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Rev Fac Agron (LUZ) 28 Supl 1: 434-444

Recibido: 18-09-2017

Aceptado: 06-11-2017