

Multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* clon 'INIVIT MC-2001' en sistemas de cultivo semi-automatizados

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

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

RESUMEN

Una de las alternativas para incrementar los rendimientos en el cultivo de la malanga (*Colocasia esculenta*), puede ser la aplicación de los métodos biotecnológicos, especialmente los sistemas semi-automatizados. El nuevo clon de malanga 'INIVIT MC-2001', con alto potencial productivo, presenta bajos coeficientes de multiplicación en los sistemas convencionales de producción de semilla. Por ello, este trabajo se propuso determinar el efecto de los sistemas semi-automatizados en la multiplicación *in vitro* de malanga 'INIVIT MC-2001'. Se estudió el efecto de tres sistemas de cultivo semi-automatizados: sistema de inmersión temporal, sistema de inmersión constante con aireación al medio de cultivo y sistema de inmersión constante con aireación a la atmósfera interna del frasco de cultivo. El tipo de sistema de cultivo semi-automatizado influyó sobre el coeficiente de multiplicación, los mejores resultados se obtuvieron con el sistema de inmersión temporal (8.46) y el sistema de inmersión constante con aireación al medio de cultivo (8.42) los cuales constituyen alternativas para incrementar el coeficiente de multiplicación en el clon 'INIVIT MC-2001'.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, inmersión temporal, malanga

In vitro multiplication of *Colocasia esculenta* clone 'INIVIT MC-2001' in semi-automated culture systems

ABSTRACT

One alternative to increase yields in the taro (*Colocasia esculenta*) culture, could be the application of biotechnological methods, especially semi-automated systems. The new clone 'INIVIT MC-2001' with high productive potential, have low multiplication coefficients in conventional seed production systems. Therefore, the aim of this paper was to determine the effect of semi-automated systems on the *in vitro* multiplication of taro 'INIVIT MC-2001'. The effect of three semi-automated systems culture was studied: temporary Immersion system, immersion system with constant aeration to the culture medium and constant immersion system with aeration to the inner atmosphere of the culture recipient. The type of semi-automated culture system influenced the multiplication coefficient, the best results were obtained with the temporary immersion system (8.46) and the immersion system with constant aeration of the culture medium (8.42) which are alternatives for increasing the multiplication coefficient in clone 'INIVIT MC-2001'.

Key words: *in vitro* culture, taro, temporary immersion

INTRODUCCIÓN

El clon de malanga (*Colocasia esculenta*) 'INIVIT MC-2001' es un mutante seleccionado a partir del clon comercial 'Camerun-14' por dos cualidades que superan a los clones comerciales actuales del género *Colocasia* en Cuba. Éste puede cosecharse a partir de los siete meses y más del 70% de sus cormelos son similares a los de la malanga *Xanthosoma*, de mayor preferencia entre los consumidores,

a diferencia de los cormos que producen el resto de los clones de la malanga isleña, que aunque se consumen, tienen menor aceptación por parte de la población. El hecho de que el nuevo clon tenga un ciclo corto permite incorporar otra importante alternativa y es que puede rotarse con el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones de producción.

Ante la necesidad de incrementar las producciones de malanga, la biotecnología

ofrece herramientas que permiten la obtención de material vegetal de plantación de alta calidad genética y fitosanitaria en poco tiempo (González *et al.*, 2005). Ello podría reducir en al menos dos años la introducción de nuevos clones a la producción (George y Klerk, 2008).

En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), se ha generado una metodología para la multiplicación *in vitro* del nuevo clon 'INIVIT MC-2001' con vistas a contribuir a su extensión y generalización en la agricultura cubana (Gálvez *et al.*, 2013a; Gálvez *et al.*, 2013b). Sin embargo, se requiere elevar los coeficientes de multiplicación.

Los sistemas de cultivo de inmersión temporal (SIT) evitan los problemas de asfixia e hiperhidricidad, los daños mecánicos y utilizan equipamiento menos complejo (Jiménez, 2005; Escalona, 2006). Con este tipo de sistemas también es posible lograr un aumento en la eficiencia de la micropropagación, dado por el incremento de los ritmos de producción y la calidad de los propágulos (Berthouly y Etienne, 2005). Por ello, podría ser una alternativa para incrementar el coeficiente de multiplicación en el clon 'INIVIT MC-2001'.

En los SIT intervienen una serie de factores físicos, mecánicos y ambientales que posibilitan obtener una mejor respuesta fisiológica y lograr una mayor eficiencia en el cultivo con respecto a los medios de cultivo líquidos estáticos (Escalona, 2006). A partir del principio de la inmersión temporal, han sido desarrollados numerosos sistemas de cultivo eficientes en diversas especies de plantas (Berthouly y Etienne, 2005).

A pesar de sus ventajas como método de micropropagación, los sistemas semi-automatizados, requieren la correcta estandarización de sus condiciones de uso en cada especie y clon para evitar pérdidas en el proceso *in vitro*. Por esa razón, este trabajo tuvo como objetivo: determinar el efecto de tres sistemas de cultivo semi-automatizados en el incremento del coeficiente de multiplicación del clon 'INIVIT MC-2001'.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT); ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

Material vegetal

Se utilizaron explantes del clon de malanga *Colocasia* 'INIVIT MC-2001' que procedían del primer subcultivo en medio de cultivo de multiplicación (Galvez *et al.*, 2013b). El manejo de los explantes se realizó según las especificaciones de calidad para la propagación *in vitro* de la malanga (MINAG, 2010).

Medio de cultivo

Para el desarrollo de los experimentos, se empleó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) con 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP (6-bencilaminopurina) (Galvez *et al.*, 2013b). El pH del medio 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.

El medio de cultivo y los frascos de cultivo que se emplearon se esterilizaron por calor húmedo en autoclave vertical (BK-75) a 121°C y 1.20 kg.cm⁻². El tiempo de esterilización varió en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar.

Con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación en malanga 'INIVIT MC-2001' se estudió el efecto de tres sistemas de cultivo *in vitro* semi-automatizados:

1. Sistema de inmersión temporal (SIT).
2. Sistema de inmersión constante con aireación al medio de cultivo (SICAMC).
3. Sistema de inmersión constante con aireación a la atmósfera interna del frasco de cultivo (SICA).

El SIT estuvo compuesto por dos frascos de cultivo tipo Clearboys (Nalgene) de 5.0 litros de capacidad, uno para el crecimiento de los brotes y el otro como reservorio de medio de cultivo. En el resto de los tratamientos se utilizaron frascos desechables de igual volumen. Para el SICAMC se conecta el único frasco directamente a la bomba de vacío para que mantenga la aireación constante del medio mientras que; en el tercer caso (SICA) se

mantienen los explantes a tiempo completo dentro del medio de cultivo.

En cada sistema de cultivo se colocaron 50 explantes y un volumen de 1500 ml de medio de cultivo de multiplicación. Para el sistema de inmersión temporal se empleó un tiempo de 14 minutos de inmersión y frecuencia de inmersión cada seis horas (Santos *et al.*, 2011). Se utilizaron cinco sistemas por tratamiento y los experimentos se repitieron tres veces. A los 30 días de cultivo se calculó el coeficiente de multiplicación de los explantes para cada tratamiento.

Análisis estadísticos

Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS ver. 16.0, para el sistema operativo Windows. Como los datos cumplían el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianza se realizaron análisis estadísticos de varianza simple y se empleó la prueba de Tukey.

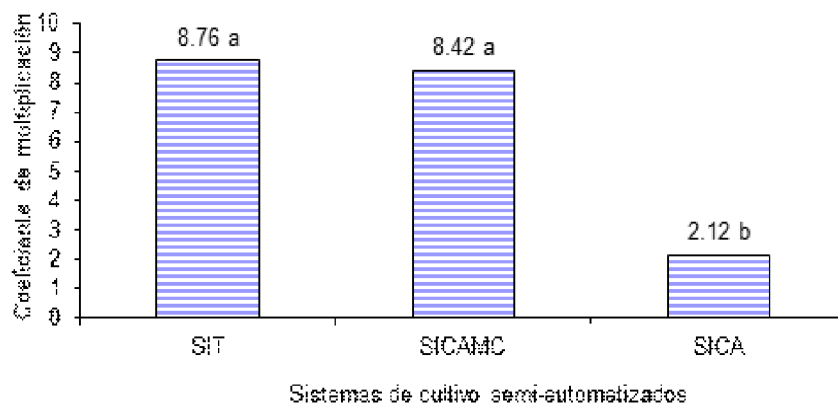
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tipo de sistema de cultivo semi-automatizado influyó sobre el coeficiente de multiplicación. Los mejores resultados a los 30 días de cultivo se obtuvieron en los explantes con el sistema de inmersión temporal y el sistema de inmersión constante con aireación al medio de cultivo sin diferencias significativas entre ellos

(Figura 1). En ambos casos, esta variable fue cuatro veces mayor en comparación con el sistema que posee aireación a la atmósfera gaseosa del frasco de cultivo.

Las condiciones de cultivo que se crearon en el SIT y en SICAMC permitieron mejor crecimiento y multiplicación de los explantes de malanga comparado con los SICA. En los sistemas de cultivo semi-automatizados con aireación forzada se conjugan factores que permiten un contacto continuo del medio de cultivo con el material vegetal, lo cual posibilita un aporte más eficiente de elementos nutritivos y una renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo (Berthouly y Etienne, 2005; Escalona, 2007; Cabrera *et al.*, 2012). Sin embargo, el sistema de inmersión constante con aireación a la atmósfera interna del frasco de cultivo provocó una considerable reducción de la humedad relativa en el interior del frasco de cultivo lo que provocó que los explantes se secaran y se agotara con rapidez el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos con el empleo de SICMC (Figura 2) están en correspondencia con lo descrito por Kozai *et al.* (2005) y Cabrera *et al.* (2011). Ellos observaron que la aplicación de aire previamente humedecido, permitió la renovación de la atmósfera interna del frasco de cultivo e incrementó la multiplicación y crecimiento de los materiales vegetales cultivados *in vitro*.



Medias con letras no comunes difieren según prueba de Tukey para $p < 0.05$

Figura 1. Efecto de los sistemas de cultivo semi-automatizados sobre el coeficiente de multiplicación de explantes de malanga 'INIVIT MC-2001' a los 30 días de cultivo. Sistema de inmersión temporal (SIT), Sistema de inmersión constante con aireación al medio de cultivo (SICAMC) y Sistema de inmersión constante con aireación a la atmósfera interna del frasco de cultivo (SICA).



Figura 2. Multiplicación de explantes de malanga 'INIVIT MC-2001' en sistema de inmersión constante con aireación al medio de cultivo.

En el cultivo de malanga, Santos *et al.* (2011) desarrollaron una metodología para la multiplicación en SIT del clon de malanga *Xanthosoma* 'Viequera'. Estos autores, con el empleo de frascos de 250 ml, 14 minutos de inmersión cada seis horas, ocho brotes por frasco, 15 ml de medio de cultivo por brote y un tiempo de cultivo de 18 días obtuvieron la mejor respuesta del material vegetal y el mayor coeficiente de multiplicación (10.40). Sin embargo, escasos trabajos se han desarrollado con la utilización del sistema de inmersión continua con aireación al medio de cultivo, el cual resultó ser eficiente para la multiplicación del clon de malanga 'INIVIT MC-2001'. Este tipo de sistema de cultivo, por su bajo costo y facilidad de instalación para su puesta en funcionamiento, resulta más económico, en comparación con el SIT y su aplicación y generalización son factibles para incrementar la multiplicación de explantes de malanga. Al mismo tiempo, al ser un sistema que utiliza frascos desechables facilita el manejo de los explantes hacia las Biofábricas con un riesgo mínimo de pérdidas por contaminación microbiana y permite el traslado de gran número de explantes en menor espacio, lo que humaniza el trabajo y evita el engorroso manejo de la cristalería.

CONCLUSIONES

Se logró la multiplicación *in vitro* de la malanga clon 'INIVIT MC-2001' en sistemas de cultivo semi-automatizados. El tipo de sistema empleado tuvo efecto sobre el coeficiente de multiplicación. El sistema de inmersión temporal (SIT) y el sistema de inmersión constante con aireación al medio de cultivo

(SICAMC) mostraron coeficientes significativamente superiores al sistema de inmersión constante con aireación a la atmósfera interna del frasco de cultivo (SICA).

REFERENCIAS

Berthouly M, Etienne H (2005) Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide A K, Preil W (Eds). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 165-195. Springer. Dordrecht

Cabrera M, Kosky RG, Espinosa E, Espinosa A (2012) Effect of semi-automated culture systems on yam (*Dioscorea alata* L.) microtuber formation. *Biotechnol. Agron Soc Environ* 16(1): 45-47

Cabrera M, Santos A, Basail M, López J, Rayas A, Medero V (2011) Field performance of yam microtuber from temporary immersion system. *Afr. J. Biotech.* 10(46): 9268-9271

Escalona, M (2006) Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual* 48-50

Galvez D, Cabrera M, Beovides Y, Robaina A, Rodríguez S, Rodríguez D (2013a) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del clon de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001'. *Biotecnología Vegetal* 13(2): 107-112

Galvez D, Cabrera M, Beovides Y, Robaina A, Rodríguez S, Rodríguez D (2013b) Influencia de reguladores del crecimiento y el estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* clon 'INIVIT MC2001'. *Biotecnología Vegetal* 13(4): 225 – 229

González JE, Hernández R, Portal O, Pairol A, González, Y (2005) Metodología para el diagnóstico

molecular del *Virus del Mosaico de la Malanga* para la certificación de plantas *in vitro* de clones comerciales de malanga. Biotecnología Vegetal 5(1): 27-32

George EF, Klerk GJ (2008) The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. En: EF George, Merriott Somerset, Michael A. Hall (Eds.), Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, pp. 65–113. Springer. Dordrecht

Jiménez E (2005) Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide A K, W Preil (Eds). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation, pp. 197-211. Springer. Dordrecht

Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (2005) Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Springer. Dordrecht

Mehrotra S, Manoj G, Arun K, Bhartendu M (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional

micropropagation: a progress towards commercialization. Afr. J. Biotech. 6(13): 1484-1492

MINAG (2010) Propagación *in vitro* de la malanga (*Colocasia esculenta* y *Xanthosoma* spp.). Especificaciones de calidad. Ministerio de la Agricultura. La Habana

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497

Santos A, Cabrera M, Basail M, López J, Rayas A, Medero V (2011) Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma* spp). Revista Colombiana de Biotecnología 13 (2): 97-106

Recibido: 17-01-2014
Aceptado: 07-03-2014