

INCREMENTO DE LA EFICIENCIA EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LA MALANGA 'INIVIT MC-2012' (COLOCASIA ESCULENTA (L.) SCHOTT.)

Arletys Santos Pino*, Damicela Reinaldo, Jorge López Torres, Milagros Basail Pérez, Victor Medero Vega, Yenisey Gutiérrez Sánchez, Aymé Rayas Cabrera, Yoel Beovides García, Maricel Bauta Toledo.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba, CP: 53 000.

* Autor para la correspondencia: organog.biotec@inivit.cu.

RESUMEN

Entre los principales problemas para el establecimiento *in vitro* de la malanga, está la contaminación causada por bacterias, debido a que las plantas madres generalmente vienen infectadas desde el campo con estos patógenos, lo cual dificulta la introducción *in vitro* de este cultivo. Los métodos de desinfección utilizados actualmente durante la preparación del explante en el establecimiento no siempre eliminan a los microorganismos, pues cuando estos se encuentran asociados a los tejidos de la planta (endófitos) muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares asociados al tejido, y permanecer sin expresarse por largos periodos de tiempo. El presente trabajo se realizó con el objetivo de minimizar las pérdidas por contaminantes bacterianos en la micropropagación de la malanga. Se utilizaron como explantes yemas axilares y meristemos entre 0,2-0,5 mm. Se evaluó el porcentaje de contaminación en la etapa de iniciación y en cuatro multiplicaciones realizadas. En la etapa de iniciación los explantes provenientes de las yemas axilares mostraron un porcentaje de contaminación de 5,6, mientras que en los meristemos no hubo contaminación. En las cuatro multiplicaciones realizadas a los explantes provenientes de las yemas axilares, la contaminación se mostró en ascenso 27,8%, 37,4%, 43,9% y 92,9% respectivamente, mientras que los meristemos 6%, 4%, 0,5% y 0%. El empleo de este explante, aumenta la eficiencia en el establecimiento *in vitro* del cultivo.

Palabras claves: contaminación, meristemos, yemas axilares.

INCREASE OF THE EFFICIENCY IN THE *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF TARO CLONE 'INIVIT MC-2012' (COLOCASIA ESCULENTA (L.) SCHOTT.)

ABSTRACT

Contamination is among the main problems for micropropagation of taro it is caused by bacteria, because mother plants usually come infected from the field with these pathogens, which hinders the *in vitro* introduction of taro crop. Disinfection methods currently used for preparing explants in the establishment stage do not always eliminate the microorganisms, since when they are associated with plant tissues (endophytes) many are able to remain latent within the cells, in the intercellular spaces associated to tissues, and remain without expressing for long periods of time. The present study was conducted to minimize losses by bacterial contaminants in the micropropagation of taro.

Axillary buds and meristems between 0,2-0,5 mm were used as explants. The contamination percentage at the initiation stage and in four multiplications performed was evaluated. In the initiation stage, explants from axillary buds showed 5,6 % contamination, whereas meristems presented no contamination. In the fourth multiplications performed to the explants from axillary buds, contamination increased to 27,8%, 37,4%, 43,9% and 92,9% respectively, while meristems recorded 6%, 4%, 0,5% and 0%. This explants, increase efficiency in establishing *in vitro* culture.

Keywords: contamination, meristems, axillary buds.

La fase de establecimiento *in vitro* constituye la etapa fundamental en la micropropagación, pues de ella depende su eficiencia o el posible mantenimiento *in vitro* de las plantas, así como la eliminación de contaminaciones. En la malanga, la mayoría de los protocolos de iniciación comienzan a partir de yemas axilares o ápices meristemáticos, al igual que en muchos otros cultivos (Rodríguez, *et al.*, 2003).

Entre los principales problemas para el establecimiento *in vitro* de la malanga, está la contaminación causada por bacterias, debido a que las plantas madres generalmente vienen infectadas desde el campo con estos patógenos, lo cual dificulta la introducción *in vitro* de este cultivo.

El efecto de los microorganismos contaminantes sobre las vitroplantas puede ser considerable si se tiene en cuenta que compiten por ellas con los nutrientes del medio de cultivo y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de metabolitos tóxicos, etc. (Leifert *et al.*, 1994).

Los métodos de desinfección utilizados actualmente durante la preparación del explante en el establecimiento no siempre eliminan a los microorganismos, pues cuando estos se encuentran asociados a los tejidos de la planta (endófitos) muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares asociados al tejido, y permanecer sin expresarse por largos periodos de tiempo (Van den Houwe y Swennen, 2000).

Por ello, se requieren alternativas para mejorar la eficiencia de esta fase del proceso. El objetivo de este trabajo fue minimizar las pérdidas por contaminantes bacterianos en la micropropagación de la malanga 'INIVIT MC-2012'.

Material Vegetal

Se seleccionaron en áreas de semilla certificada del INIVIT, plantas del clon de malanga 'INIVIT MC-2012' (*Colocasia esculenta*) debido a su interés en el Programa de Producción de Semillas de este cultivo en Cuba, motivado por los hábitos de consumo y alto potencial productivo.

Introducción *in vitro* del cultivar objeto de estudio

Para la obtención de explantes libres de contaminantes endógenos se estudió el establecimiento *in vitro* a partir de meristemos en comparación con yemas axilares.

- Para el establecimiento *in vitro* de los meristemos fueron seleccionados cormos de plantas típicas del clon objeto de estudio, según los descriptores de la especie, sin la presencia de síntomas visuales de enfermedades. Se colocaron a

grelar en zeolita, cuando los brotes tuvieron un tamaño aproximado de 3 cm de diámetro se cortaron y lavaron con detergente y agua corriente, seguido de enjuagues con agua estéril.

- Para el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares se cortaron las vainas foliares de las plantas, a un tamaño aproximado de 4 cm de diámetro, se lavaron con detergente y agua corriente, seguido de enjuagues con agua estéril.

Bajo condiciones de asepsia (cabina de flujo laminar) se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% (v/v), durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua desionizada estéril tres veces según García *et al.* (1999).

Para la extracción de los meristemos, se procedió a eliminar las vainas foliares y extraer el meristemo, con la ayuda de un microscopio estereoscópico modelo STEMI SV 11. El establecimiento de los mismos se realizó en el medio de cultivo constituido por el 80% de las sales y vitaminas Murashige y Skoog ("MS") (1962); 30 g.L⁻¹ de sacarosa; 0,1 mg.L⁻¹ de 6 bencilaminopurina (6-BAP); 0,1 g.L⁻¹ de miolnositol, el pH fue ajustado a 5,7 con NaOH 0,5 N y/o HCL 0,5 N antes de la esterilización en autoclave. La duración de esta fase fue de 21 días de cultivo (García *et al.*, 1999).

Durante la fase de establecimiento se observó que los explantes provenientes de las yemas axilares mostraron un porcentaje de contaminación de 5,6, mientras que en los meristemos no hubo contaminación. En las cuatro multiplicaciones realizadas a los explantes provenientes de las yemas axilares la contaminación se mostró en ascenso, mientras que a partir de meristemos el porcentaje de contaminación fue menor (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia del tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del clon de malanga 'INIVIT MC-2012'.

Tipo de explante	Número de subcultivo	Número de explantes	% de contaminación
Yemas axilares	Iniciación	1032	5,6
	1 Multiplicación	914	27,8
	2 Multiplicación	706	37,4
	3 Multiplicación	442	43,9
	4 Multiplicación	228	92,9
Meristemos	Iniciación	33	0
	1 Multiplicación	33	6,0
	2 Multiplicación	50	4,0
	3 Multiplicación	100	2,0
	4 Multiplicación	189	0,5

A través del cultivo de meristemos se lograron obtener mayor cantidad de plantas libres contaminantes, con una marcada diferencia con respecto al uso de yemas axilares.

Resultados similares obtuvo Astudillo (2013), en el establecimiento *in vitro* de meristemas apicales de la malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott), al obtener solo un 1,15 % de contaminación por bacterias.

La técnica de cultivo de meristemos, como método de saneamiento, se fundamenta en la distribución no uniforme de los microorganismos (virus, bacterias, micoplasmas) en los tejidos de las plantas infectadas, y su disminución progresiva hacia el ápice del tallo.

Por tanto, son mayores las posibilidades que las células del meristemo apical se encuentren libres de microorganismos, a diferencia de los tejidos más organizados de las plantas (Ayala, 2013).

Gálvez (2013), en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares del clon de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001', logró de 150 ápices de yemas axilares a establecer *in vitro* una pérdida por contaminación microbiana o muertes de 21,93, de ellos un 14,62 % por contaminación.

Para explicar la sanidad o limpieza del meristemo se han formulado varias hipótesis, una de ellas plantea, que debido a la ausencia de tejido vascular en la proximidad del meristemo apical y que las conexiones plasmodermáticas en las células de este tejido son muy pequeñas, por tanto los microorganismos se desplazan muy lentamente hacia esta zona (Ayala, 2013). Esta característica morfológica, unida a la activa multiplicación celular que allí ocurre, puede explicar la baja concentración o la ausencia de patógenos en este tejido.

CONCLUSIONES

El empleo de los meristemos como explante inicial, aumenta la eficiencia en el establecimiento *in vitro* de la malanga 'INIVIT MC-2012' logrando disminuir las pérdidas por contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

- ASTUDILLO ROBLES, J E. 2013. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott). Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Honduras. 17 pp.
- AYALA P. 2013. Obtención de plantas libres de enfermedades mediante el cultivo de meristemos de Alamo (*Populus alba*). Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE Sangolquí - Ecuador.
- CARRAZANA D., SANTOS A., ALDERETE Y., GÁLVEZ D., CUPULL R., NAVARRRO M. 2011. Bacteria endófito latente no vitropatógena 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. Y RODRÍGUEZ D. 2013. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del clon de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001'. *Biotecnología Vegetal*. 13(2):107-112.
- LEIFERT, C, MORRIS CE Y WAITES WM. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139-183.
- RODRÍGUEZ A., QUINTERO S, RODRÍGUEZ A. J, FUNDORA Z. 2003. Establecimiento *in vitro* de ápices de malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). *Cultivos Tropicales* 24(3): 19-22.

- SANTOS A., GARCÍA M., CARRAZANA D., LÓPEZ J, VENTURA J., BASAIL M., MEDERO V., CABRERA M., RAYAS A., GÁLVEZ D., BAUTA M., ÁLVAREZ M. Y ORTEGA A. 2005. Prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de la malanga clon 'Camerún 14' (*Colocasia esculenta*). *Centro Agrícola* 32(3):31-34.
- VAN DEN HOUWE, I. y SWENNEN, R. 2000. Characterization and control of bacterial contaminants *in vitro* cultures of banana (*Musa* spp.). *Acta Hortic.* 530(1): 69-79.