

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA DE POLIETILENGLICOL 6000 PARA LA SELECCIÓN TEMPRANA DE TOLERANCIA A LA SEQUÍA EN PLANTAS *IN VITRO* DE *Colocasia*

Arletys Santos Pino*, Jorge López Torres, Aymé Rayas Cabrera, Víctor Medero Vegas, Milagros Basail Pérez, Yoel Beovides García, Damicela Reinaldo Alvares.

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

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

Recibido: 4 de mayo de 2022; Aceptado: 15 de junio de 2022

RESUMEN

La malanga [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] es uno de los cultivos más importantes en el mundo en desarrollo. Sus cormos comestibles son una rica fuente de carbohidratos y minerales. El cultivo de la malanga requiere altas condiciones de humedad, por lo que el déficit hídrico afecta su crecimiento y productividad. La selección *in vitro* de plantas ofrece ventajas sobre la selección en campo pues ahorra tiempo, recursos y permite trabajar con mayores volúmenes de individuos. Para este tipo de selección es necesario establecer una serie de condiciones. El objetivo del presente trabajo fue determinar la dosis letal media de Polietilenglicol 6000 (PEG-6000) para la selección temprana de tolerancia a la sequía en plantas *in vitro* del cultivar de *Colocasia* 'Isleña Rosada Escambray'. Las plantas fueron sometidas a cuatro concentraciones de PEG-6000 (50, 100, 150 y 200 g.L⁻¹) en medio de cultivo semisólido de multiplicación, y un tratamiento control sin la presencia de esta sustancia. Como indicadores de estrés se evaluaron las variables altura de la planta, número de hojas, número de brotes, área foliar y masa fresca. En las plantas sometidas a estrés se observó una disminución en la altura y el número de brotes, así como el peso fresco. Teniendo en cuenta estos resultados, el uso 128 g.L⁻¹ del PEG-6000 como agente inductor de estrés hídrico, podría permitir la selección de plantas *in vitro* de malanga *Colocasia* tolerantes a la sequía.

Palabras claves: área foliar, dosis letal media, malanga, osmoestresante.

DETERMINATION OF THE MEAN LETHAL DOSE OF POLYETHYLENE GLYCOL 6000 FOR THE EARLY SELECTION OF DROUGHT TOLERANCE *IN VITRO* PLANTS OF *Colocasia*

ABSTRACT

Taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] is one of the most important crops in the developing world. Its edible corms are a rich source of carbohydrates and minerals. Taro cultivation requires high humidity conditions, so water deficit affects its growth and productivity. The *in vitro* selection of plants offers advantages over field selection as it saves time, resources and allows working with larger volumes of individuals. For this type of selection, it is necessary to establish a series of conditions. The objective of this work was to determine the mean lethal dose of Polyethylene Glycol 6000 (PEG-6000) for early selection of tolerance to drought in *in vitro* plants of the *Colocasia* cultivar

'Islaña Rosada Escambray'. The plants were subjected to four concentrations of PEG-6000 (50, 100, 150 and 200 g.L⁻¹) in semisolid multiplication culture medium, and a control treatment without the presence of this substance. As stress indicators, the variables plant height, number of leaves, number of shoots, leaf area and fresh mass were evaluated. In plants subjected to stress, a decrease in height and number of shoots, as well as fresh weight, was observed. Taking these results into account, the use of 128 g.L⁻¹ of PEG-6000 as an inducing agent of water stress could allow the selection of *in vitro* plants of the taro that are tolerant to drought.

Keywords: leaf area, mean lethal dose, taro, osmostress.

INTRODUCCIÓN

La malanga *Colocasia esculenta* (L.) Schott es uno de los cultivos alimentarios más importantes en el mundo en desarrollo. Sus cormos comestibles son una rica fuente de carbohidratos y minerales. Además, la tarina, una glicoproteína obtenida de la malanga, se utiliza con fines medicinales, como antitumorales, actividades antihiper glucémicas y antihiperlipidémicas (Pereira *et al.*, 2020; Gouveia *et al.*, 2020). Más del 95 % de las especies están presentes desde los trópicos siempre húmedos hasta los bosques templados y pueden crecer en hábitats acuáticos o áridos (Puebla y Pra'mparo, 2019). La producción de malanga a menudo amenazada por la escasez de agua reduce al 90% del rendimiento o pérdida total del cultivo (Ravi y Chowdhury, 1997). El factor principal que limita el crecimiento de este cultivo es la cantidad de humedad del suelo disponible para el cultivo durante la temporada de crecimiento.

Esta problemática ha llevado a pensar en la necesidad de contar con genotipos tolerantes al déficit hídrico, ya que para su producción el agua constituye uno de los factores más limitantes (Vanhove *et al.*, 2012). La selección de cultivares tolerantes en condiciones de campo es compleja debido a dificultades en los manejos agrícolas, las variaciones fenotípicas y la ocurrencia de eventos lluviosos inesperados (Placide *et al.*, 2012). En su lugar, la selección *in vitro* ofrece múltiples ventajas, entre ellas que se pueden controlar las condiciones de cultivo, permite el trabajo con grandes volúmenes de individuos en espacios más reducidos, y ahorra tiempo y recursos. Además, existe una correlación en las respuestas de las plantas en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Mohamed *et al.*, 2000; Sahoo *et al.*, 2018).

Por otra parte, para seleccionar *in vitro* plantas tolerantes a déficit hídrico es necesario simular este tipo de estrés bajo estas condiciones. Como agentes inductores de estrés a nivel de laboratorio se usan sustancias denominadas 'osmoestresantes' que al incorporarse a los medios de cultivo disminuyen su potencial osmótico, retienen las moléculas de agua y dificultan su absorción por parte de los tejidos vegetales. De esta manera se puede inducir en las plantas una sequía fisiológica. Algunos ejemplos de sustancias osmoestresantes son el manitol, sorbitol, sacarosa y polietilenglicol (PEG). De todas ellas, la última es una de las más empleadas (Rai *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la dosis letal media de Polietilenglicol 6000 (PEG-6000) para la selección temprana de tolerancia a la sequía en plantas *in vitro* del cultivar de *Colocasia* 'Islaña Rosada Escambray'.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Material vegetal

Se emplearon plantas *in vitro* del cultivar de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. 'Isleña Rosada Escambray' en fase de multiplicación en el tercer subcultivo, propagadas por organogénesis según el protocolo propuesto por García *et al.*, (1999) y Santos *et al.*, (2017). A partir de las plantas se obtuvieron explantes de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y 1,0 cm de altura que fueron colocados en el medio de cultivo empleado para el estudio.

Medio de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo semisólido de multiplicación, compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30 g.L⁻¹; 6-BAP 3 mg.L⁻¹; AIA 1 mg.L⁻¹; mioinositol 0,1 g.L⁻¹ y Agar 2,5 g.L⁻¹ (García *et al.*, 1999).

Para inducir el estrés hídrico *in vitro* se adicionó al medio de cultivo el PEG 6000. Las plantas fueron sometidas a cuatro concentraciones de PEG-6000 (50, 100, 150 y 200 g.L⁻¹) en medio de cultivo semisólido de multiplicación, y un tratamiento control sin la presencia de esta sustancia. El pH fue ajustado a 5,7 con NaOH (0,5 N) y/o HCl (0,5 N), y el medio de cultivo se distribuyó en tubos de ensayo de vidrio de 150 mm de largo x 26 mm de diámetro (10 ml por tubo). Posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1,2 kg cm⁻² de presión durante 15 min.

Condiciones de crecimiento

Las condiciones de cultivo utilizadas fueron temperatura de 27±2,0°C e iluminación artificial mediante tubos fluorescentes, con régimen de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 62-68 μmol m⁻²s⁻¹). Luego de 21 días bajo estas condiciones, se evaluaron las variables altura de las plantas, área foliar, masa fresca, número de brotes y número de hojas.

Altura de las plantas (cm): Fue medida con una regla graduada desde la base de la planta hasta el punto de inserción en el pseudotallo de la última hoja completamente emitida.

Área foliar (AF): Se calculó de acuerdo con el método de medición lineal descrito por Biradar *et al.* (1978). La longitud y el ancho de la hoja se multiplicaron por 0,917 para calcular el área de la hoja (AF = longitud × ancho × 0,917).

La masa fresca (MF) se obtuvo tras pesar las plantas inmediatamente después de extraerlas de los tubos de cultivo, se utilizó una balanza analítica (SARTORIUS), la cual fue expresada en gramos de masa fresca (gMF).

Procesamiento estadístico

El experimento fue repetido tres veces, en cada una se emplearon 20 plantas para cada tratamiento, para un total de 60 plantas respectivamente. Para el análisis estadístico de los datos experimentales se empleó el programa SPSS Statistics ver. 25.0 para Windows. Para el procesamiento de los resultados se comprobó la normalidad y la

homogeneidad de varianzas por las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de rangos múltiple de Tukey ($p < 0,05$).

Para calcular la DL₅₀ se realizó un análisis de regresión lineal y se graficó las correlaciones de los diferentes descriptores morfológicos y fisiológicos utilizando Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 21 días de cultivo se observó una reducción de todas las variables evaluadas en presencia de PEG 6000, cuando fueron comparadas con las plantas del tratamiento control (Tabla 1). Los tratamientos con 150 y 200 g.L⁻¹ del agente osmoestresante no fue posible calcular el área foliar de las plantas pues no emitieron hojas.

Tabla 1. Respuesta al estrés hídrico inducido por el polietilenglicol 6000 (PEG 6000), en indicadores morfológicos y fisiológicos, en el cultivar de *Colocasia* 'Isleña Rosada Escambray'.

Tratamiento PEG-6000	Altura (cm)	Número de brotes	Hojas abiertas	Área foliar (cm ²)	Peso fresco (gMF)
1 (Control)	2,14 a	3,00 a	1,93 a	1,19 a	0,94 a
2 (50 g.L ⁻¹)	1,73 b	1,53 b	1,33 b	0,23 b	0,60 b
3 (100 g.L ⁻¹)	1,22 c	1,53 b	0,13 c	0,26 b	0,44 bc
4 (150 g.L ⁻¹)	1,18 c	0,90 bc	0 c	0 b	0,40 bc
5 (200 g.L ⁻¹)	0,54 d	0,27 c	0 c	0 b	0,18 c

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Tukey.

Resultados similares fueron obtenidos por Sahoo *et al.*, (2006) al utilizar 118 g.L⁻¹ de PEG-6000, en la inducción de stress osmótico en tres cultivares híbridos de *Colocasia*.

Moreno-Bermúdez *et al.*, (2017) determinaron que la mínima concentración de PEG-6000 para seleccionar *in vitro* plantas de *Musa* spp. tolerantes al déficit hídrico puede ser 3 %, en los cultivares 'Grande naine' (AAA) y 'Pelipita' (ABB). Con esta dosis disminuyeron significativamente las variables altura de la planta, área foliar, masa fresca y masa seca.

En la figura 1 se presentan las gráficas de tendencia, ecuación de regresión lineal y Coeficiente de determinación (R^2) para cada variable morfológica y fisiológica evaluada del cultivar 'Isleña Rosada Escambray'. En las variables evaluadas la curva de ajuste con base a la ecuación lineal mostró una correlación negativa entre cada variable y las dosis de PEG 6000.

Tomando en cuenta el R^2 de cada variable altura de planta (0,957), número de brotes (0,9013), hojas abiertas (0,8394), área foliar (0,6515) y peso fresco (0,8827), se seleccionó la variable altura de plantas para calcular la DL₅₀ por presentar el coeficiente de determinación superior al resto de variables indicando un mejor ajuste. A partir del modelo obtenido, se obtuvo una DL₅₀ de 128 g.L⁻¹ de PEG-6000. Este valor puede ser utilizado como concentración selectiva para la identificación *in vitro* de posibles mutantes tolerantes a la sequía.

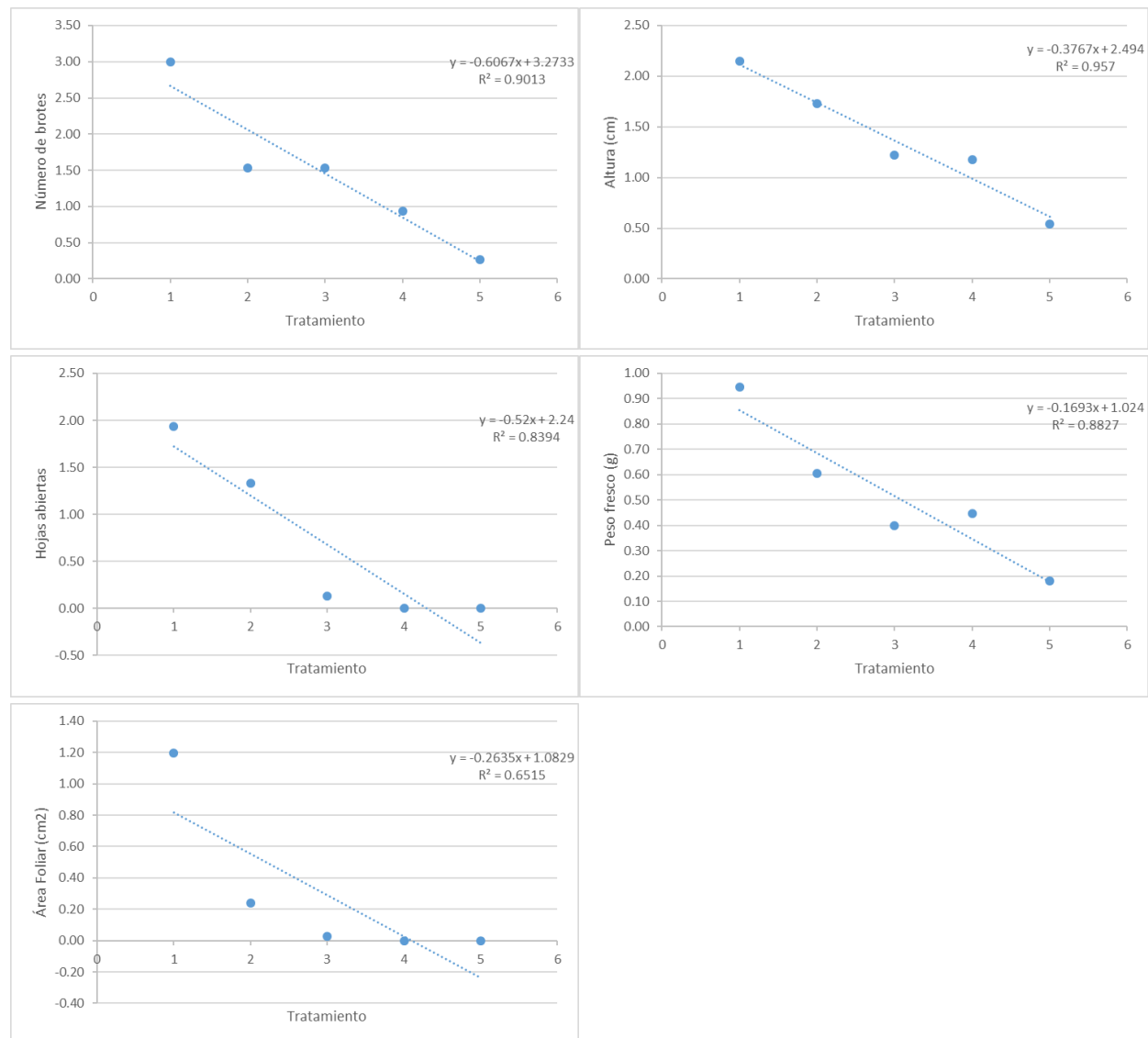


Figura 1. Correlaciones de los diferentes descriptores morfológicos y fisiológicos frente al PEG-6000 en el cultivar 'Isleña Rosada Escambray'. A: Número de brotes; B: Altura; C: Número de hojas; D: Peso fresco; E: Área foliar. A los 21 días de cultivo.

Resultados similares fueron obtenidos por Susetio *et al.* (2019) en cultivares tetraploides de *Colocasia*, obteniendo una DL_{50} entre 121,6 y 135,4 g.L⁻¹ de PEG (6000).

Mancilla-Álvarez *et al.* (2019) en estudios realizados con diferentes métodos de conservación en *Malanga Colocasia*, lograron obtener alta formación de brotes al utilizar entre 10 y 20 g.L⁻¹ de PEG (8000).

Se observaron diferencias en el número de brotes y la altura entre plantas sometidas a estrés hídrico y el control. Estas diferencias comenzaron a notarse a partir de los 10 días del período experimental, y fueron significativas al finalizar el experimento a los 21 días de cultivo (Figura 2).

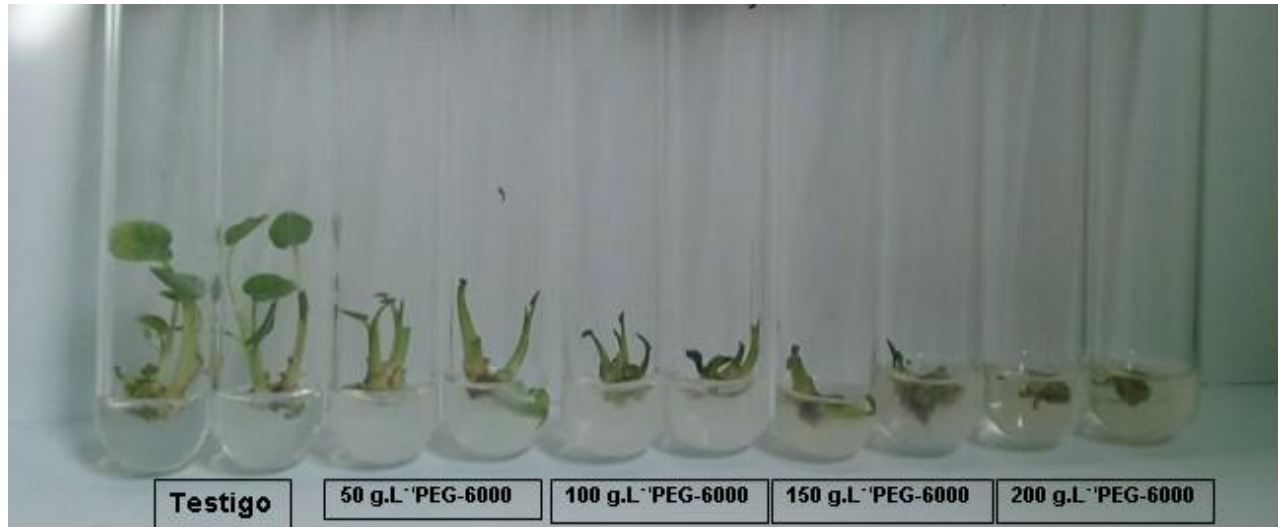


Figura 2. Plantas *in vitro* de malanga cv. 'Isleña Rosada Escambray' sometidas a estrés hídrico inducido por Polietilenglicol 6000 en medio de cultivo de multiplicación a los 21 días de cultivo.

CONCLUSIONES

A partir del modelo obtenido, se obtuvo una DL_{50} de 128 g.L^{-1} de PEG-6000. Este valor puede ser utilizado como concentración selectiva para la identificación *in vitro* de posibles mutantes tolerantes a la sequía en *Colocasia*.

BIBLIOGRAFÍA

- BIRADAR, R.S.; T. VENKATESWARALU and N. HRISHI.1978. Leaf area estimation in *Colocasia*. *Journal Root Crops*, 4: 51-53.
- GALVEZ, D.; S. RODRÍGUEZ; Y. BEOVIDES; M.D. MILIÁN; R. GÓMEZ-KOSKY y L. POSADA. 2020. New knowledge for increased efficiency of Araceae micropropagation *in vitro*. *Biotechnología Aplicada*, 37(3):3501-3.
- GARCÍA, M.; V. MEDERO; S. RODRÍGUEZ; J. LÓPEZ; J. VENTURA; M. CABRERA; R. HERNÁNDEZ; J.E. GONZÁLES; D. BERMÚDEZ; D. GÁLVEZ; V. GUTIÉRREZ y J.R. GÁLVEZ.1999. Generalización de la metodología para la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. En: Alvarado-Capó Y, Gregorio O (eds). 5^{to} Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, Santa Clara, 16-9/junio/1999, pp. 167-169.IBP, Santa Clara; ISBN: 959-7122-03-0.
- GOUVEIA, C.; J.F.T. GANANÇA; H.G.M. DE NÓBREGA; J.G.R. DE FREITAS; V. LEBOT and M.Â.A.P DE CARVALHO. 2020. Phenotypic flexibility and drought avoidance in taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 32, 150-159.
- MANCILLA-ÁLVAREZ, E.; M.A. RAMÍREZ-MOSQUEDA; S. ARANO-AVALOS; R. NÚÑEZ-PASTRANA and J.J. BELLO-BELLO. 2019. *In vitro* techniques to the conservation and plant regeneration of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Hortscience*, 54(3):1-5. DOI:[10.21273/HORTSCI13835-18](https://doi.org/10.21273/HORTSCI13835-18).

- MOHAMED, M.; P. HARRIS and J. HENDERSON.2000. *In vitro* selection and characterization of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Science* 159:213-222.
- MORENO-BERMÚDEZ, L.J.; M. REYES; R. GÓMEZ-KOSKY y B. CHONG-PÉREZ. 2017. Mínima concentración de polietilenglicol 6000 para seleccionar *in vitro* plantas de *Musa* spp. tolerantes a estrés hídrico. *Biotecnología Vegetal*, 17(2):125-133.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG.1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- PEREIRA, P.R.; E.A. MATTOS; A.C.N.T.F. CORRÊA; M.A. VERICIMO and M.F. PASCHOALIN. 2020. Anticancer and Immunomodulatory Benefits of Taro (*Colocasia esculenta*) Corms, an Underexploited Tuber Crop. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 265.
- PLACIDE, R.; S.C. CARPENTIER and R. SWENNEN. 2012. Development of *in vitro* technique to screen for drought tolerant banana varieties by sorbitol induced osmotic stress. *African Journal of Plant Science*, 6(15):416- 425.
- PUEBLA, G.G.; B. VENTO and M.B. PRA´MPARO. 2019. An aquatic angiosperm of the Late Cretaceous, Mendoza Province, central-western Argentina: Its phylogenetic position in Araceae. *Historical Biology*,1-9. <https://doi.org/10.1080/08912963.2019.1687696>.
- RAI, M.K.; R.K. KALIA; R. SINGH; M.P. GONDOLA and A.K. DHAWAN. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection-An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1): 89-98; doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.10.021.
- RAVI, V. and S.R CHOWDHURY.1997. Physiological response of taro to moisture stress. *J. Root Crops*, 23: 63-66.
- SAHOO, M.R.; M. DASGUPTA and A. MUKHERJEE. 2006. Effect of *in vitro* and in vivo induction of polyethylene glycol-mediated osmotic stress on hybrid taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Annals of Tropical Research*, 28(2):1-11.
- SAHOO, M.R.; M. DASGUPTA; P.C. KOLE and A. MUKHERJEE. 2018. Photosynthetic, physiological and biochemical events associated with polyethylene glycol-mediated osmotic stress tolerance in taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Photosynthetica*, 56(4): 1069-1080.
- SANTOS, A.; J. LÓPEZ; M. BASAIL; Y. GUTIÉRREZ; A. RAYAS; V.R. MEDERO; D. RODRÍGUEZ; D. RODRÍGUEZ; Y. BEOVIDES; D. REINALDO y M. BAUTA. 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.
- SUSETIO, M.; D. EFENDI and L. SARI. 2019. The treatment of polyethylene glycol concentrations on in vitro growth of tetraploid taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) and its propagation for selection of drought tolerant. *Jurnal Biologi Indonesia*, 15(1): 9-22. DOI: 10.47349/jbi/15012019/9.

VANHOVE, A.C.; W. VERMAELEN; B. PAINS; R. SWENNEN and S.C. CARPENTIER.
2012. Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an *in vitro*
growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and
understand homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 3:1-10.