

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA *IN VITRO* PARA LA INDUCCIÓN DE MUTACIONES EN MALANGA COLOCASIA

***Víctor R. Medero Vega**, Jorge López Torres, José de la C. Ventura Martín, Milagros Basail Pérez, Aymé Rayas Cabrera, Arletys Santos Pino, Yoel Beovides García, Daniel Rodríguez Pérez, Marlenys Torres Delgado y Yanelis Bravo Corrales.**

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Santo Domingo, CP: 53000, Villa Clara, Cuba.

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

INTRODUCCION

En Cuba, las pudriciones secas en los cormos y comerlos de la malanga se ha convertido en un factor negativo para la producción del cultivo y se estiman pérdidas superiores al 80% durante el almacenamiento (Espinosa, 2003; Folgueras y Herrera, 2006). Por tal motivo, muchos productores están desmotivados para continuar incrementando sus plantaciones y por lo tanto peligra la presencia de este cultivo en el mercado.

En observaciones realizadas en campo se ha demostrado que los clones malanga del género *Colocasia esculenta* muestran mayores niveles de tolerancia o menos afectaciones por las pudriciones que los del género *Xanthosoma* spp, lo cual ha posibilitado un incremento de las áreas dedicadas a esta especie y por lo tanto una mayor demanda de clones comerciales de la misma, aunque la misma es más exigente al riego, lo cual constituye una limitante para su producción.

En el INIVIT existe un Programa para el mejoramiento genético de la malanga, pero la hibridación de este cultivo está muy afectada por el hecho de que bajo condiciones climáticas tropicales no florecen la mayoría de los clones y no es viable la semilla que se pudiera obtener. Debido a lo anterior se requiere de la utilización de las técnicas biotecnológicas como herramienta auxiliar para la mejora genética de este cultivo.

En los últimos años se ha avanzado significativamente en la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos; dentro de estas, el cultivo de meristemos y otras técnicas auxiliares que constituyen metodologías de alta eficiencia en los procesos de micropropagación y saneamiento en especies de propagación vegetativa tan importantes como la malanga. Esta característica ha servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante selección, mutación, programas de mejora y manipulación genética (Cañal, 1999).

La variación somaclonal registrada en plantas generadas *in vitro* a través de cualquier vía, es una de las fuentes más reportadas de generación de variantes genotípicas. Este fenómeno es más significativo cuando se emplea la organogénesis indirecta (producción de callos para la posterior regeneración de plantas) como estrategias de reproducción (López, 2002).

El Cultivo de Tejidos da la posibilidad de obtener nuevos genotipos a través de la variación somaclonal, y nuevos clones de malanga han sido seleccionadas debido a cambios morfológicos producidos en plantas regeneradas a partir de callos (Gupta, 1985). La variación genética de las plantas puede ser incrementada mediante la aplicación de mutágenos físicos y químicos. Plantas con diferentes niveles de tolerancia a las pudriciones de los cormos, han sido obtenidas mediante el empleo de irradiaciones de ápices meristemáticos con rayos gamma, (Saborío *et al.*, 2004, Reyes 2006). Además, la inducción de tetraploides, mediante el empleo de colchicina, ha sido descrito por Esnard *et al.*, 1993 y Tambong *et al.*, 1998, sin mostrar los resultados del comportamiento en campo de las plantas obtenidas.

La integración de un sistema de mejoramiento desde los cruzamientos, la inducción de mutaciones y la transgénesis constituyen una estrategia para la mejora de este cultivo en Cuba. El mejoramiento por mutaciones a través del Cultivo de Tejidos *in vitro* abre grandes posibilidades en la inducción y selección de mutantes en plantas de propagación vegetativa (Novak *et al.*, 1990). Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó el presente trabajo con el objetivo de establecer una metodología para la mejora genética de la malanga *Colocasia esculenta* por inducción de mutaciones *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Se utilizaron los clones de malanga *Colocasia esculenta*: 'INIVIT MC-2001', 'INIVIT MC-2006' e 'INIVIT MC-2012'.

Para la implantación *in vitro* fueron seleccionadas plantas *plus* del Banco de Germoplasma del INIVIT. La desinfección de los cormos se realizó mediante el proceso de sumergir en alcohol (70%) durante un minuto los explantes previamente lavados con detergente al 1 %, después sumergir en una solución de hipoclorito de sodio (2,5 %) durante 10 minutos y finalmente enjuagar 3 veces con agua desionizada estéril. Se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog, (1962) al 80% de su concentración y suplementado con 100 mg/L de mioinositol, 0.1 mg/L de BAP, 10 mg/L de vitaminas "MS" y 5.5 de pH. Para la multiplicación se utilizó el medio de cultivo "MS" completo, suplementado con 100 mg/L de mioinositol, 1.0 mg/L de AIA, 3.0 mg/L de BAP, 10 mg/L de vitaminas "MS", 4,7 g/L de agar y 5.7 de pH.

Los explantes se colocaron en el cuarto de cultivo con intensidad luminosa de 3 000 - 5 000 lux y un fotoperíodo de 12 horas, los subcultivos se realizaron cada 21 días.

Para la determinación de la Dosis Letal Media (DL50) se emplearon 50 ápices meristemáticos de cada clon, los cuales se irradiaron en el Centro Nacional de Estudios Aplicados a la Energía Nuclear (CEADEN) en una fuente de Co⁶⁰ (Rayos gamma) a dosis de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 y 60 Gy. Después del tratamiento se pasaron a medio de cultivo fresco y a los 30 días de cultivo se evaluaron el porcentaje de sobrevivencia de los explantes para el cálculo de la curva dosis-efecto.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al evaluar el efecto de los diferentes tratamientos mutagénicos sobre 50 explantes con tres repeticiones, se observó que independientemente del clon utilizado a medida que aumentaron las dosis de irradiación aumentó la muerte de los explantes.

Como se observa en el gráfico 1, para los tres clones estudiados la dosis más próxima a la DL₅₀ está entre 15 y 20 Gy, con un porcentaje de sobrevivencia del 60% para el clon 'INIVIT MC-2001', 60% para 'INIVIT MC-2006' y 70% para 'INIVIT MC-2012' cuando se utilizaron 15 Gy; mientras que al someter los ápices meristemáticos a una dosis de 20 Gy sólo se logró 30% de sobrevivencia en el clon 'INIVIT MC-2001', 40% en el 'INIVIT MC-2006' y un 40% para la 'INIVIT MC-2012'. La gran mayoría de los trabajos que se encuentran publicados señalan que el rango de 25 a 35 Gy es el más útil para la inducción de mutaciones en cultivos de interés económico cuando se evalúa el efecto de dosis agudas y fraccionadas de rayos gamma. A pesar de ello, es conocido que no todos los genotipos poseen la misma radiosensibilidad a las radiaciones ionizantes y a los agentes mutagénicos en general e incluso se ha demostrado que diferentes tipos de explantes (semillas o porciones vegetativas como yemas o ápices) tienen diferentes respuestas a un mismo tratamiento mutagénico (Amano, 1992). Además, se ha encontrado que

no todos los tratamientos mutagénicos son igualmente efectivos para inducir mutaciones beneficiosas.

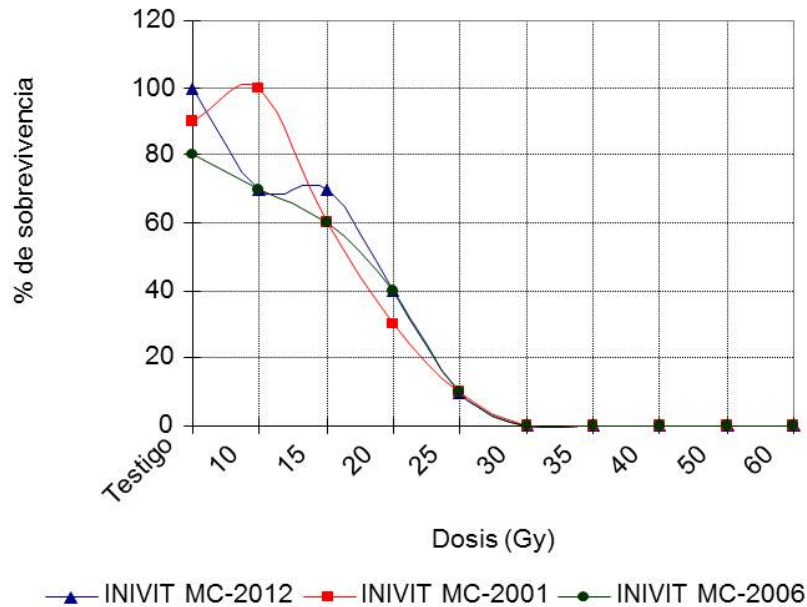


Gráfico 1. Porcentaje de sobrevivencia de los ápices meristemáticos de malanga *Colocasia*, irradiados con Co^{60} a los 30 días de cultivo *in vitro*.

También, se ha demostrado que para una dosis donde aproximadamente el 50% de los explantes mueren, es donde deben aparecer el mayor número de mutaciones beneficiosas (Novak *et al.*, 1990). Por otra parte, dosis menores pueden resultar solamente estimulantes y dosis mayores pueden ser letales o causar un número muy grande de daños. De lo anterior se infiere la necesidad y el valor que tiene encontrar las curvas dosis-efecto para el tratamiento mutagénico que se decida emplear en un esquema de mejoramiento genético.

En general, se determinó que la Dosis Letal Media (DL_{50}) para los genotipos estudiados fue de 20 Gy y que dosis superiores a 25 Gy provocan prácticamente la muerte del 100% de los explantes irradiados.

En condiciones de campo fueron seleccionados dos posibles mutantes con características agronómicas superiores al donante y con mejor respuesta ante el estrés hídrico (Figura 1).



Figura 1. Posible mutante de malanga *Colocasia* seleccionado en condiciones de stress hídrico.

REFERENCIAS

- Afza, R.; Brunner, H. y Hu, X. Mutation induction and related techniques for casava breeding. Proceeding CBN First international Scientific Meeting of the Cassava Biot. Network Colombia 25-28 August, p.122. 1992.
- Esnard, J.; Ferwerda, F.; Rivera-Amador, E. y Hepperly, P.R. Induction of tetraploidy in the tanier genotype "Inglesa" (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Plant Breeding* 111, 335-338. 1993.
- Espinosa, E. Estudio de las pudriciones secas en el cultivo de la malanga (*Xanthosoma* spp.) y *Colocasia esculenta* Schott. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Cuba, 45 pp. 2003.
- Folgueras, Maryluz y L. Herrera. Relación de hongos patógenos asociados a la pudrición seca de la malanga. *Revista Fitopatología, Sociedad Latinoamericana de Fitopatología*, Número 1. 2006.
- Gupta, P.P. Plant regeneration and variabilities from tissue cultures of cocoyams (*Xanthosoma sagittifolium* and *X. violaceum*). *Plant Cell Reports* 4, 88-91. 1985.
- Hidalgo, N., Saborío, F., Gómez L., Torres S., Valverde R., Cabrera, J.L. & Herrera, L. Transformación genética del tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). In: *Perspectivas y limitaciones de la biotecnología en países en desarrollo*. (Eds. R.M. Romero, A. Hernández & G. Solano). UCR, San José, Costa Rica, pp. 188. 2000.
- López Rosales, R.C. Producción de plantas libres de virus y morfogénesis indirecta a partir de cultivo de meristemos de tres genotipos de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Universidad Nacional Agraria Facultad de Agronomía. Nicaragua. 2002.
- Novak, F.; Afza, R.; Van Duren, M. y Omar, M. Mutation induction by Gamma irradiation of in vitro cultured shoot-tips of bananas and plantains (*Musa* cvs.). *Tropical Agriculture* 67, No. 1 January, pp. 21-28. 1990.
- Reyes Castro, G. Studies on cocoyam (*Xanthosoma* spp.) in Nicaragua, with emphasis on Dasheen mosaic virus. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae* 2006:7. 2006.

- Saborío, F., Umaña, G., Solano, W., Amador, P., Muñoz, G., Valerin, A., Torres, A. & Valverde, R. Induction of genetic variation in *Xanthosoma* spp. In: Genetic improvement of underutilized and neglected crops in low income food deficit countries through irradiation and related techniques. (Eds. International Atomic Energy Agency). Vienna, Austria, pp. 143-154. 2004.
- Tambong, J.T., Sapra, V.T. y Garton, S. In vitro induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. *Euphytica* 104, 191-197. 1998.