

# CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE RECURSOS GENÉTICOS DE RAÍCES Y TUBÉRCULOS TROPICALES

Aymé Rayas\*, Jorge López, Víctor Medero, Milagros Basail, Yoel Beovides, Arletys Santos, Yenisey Gutiérrez, Valentina Gutiérrez, Marilín Martínez, Maricel Bauta.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba. [conserv.biotec@inivit.cu](mailto:conserv.biotec@inivit.cu)

## Introducción

Para lograr un incremento de la productividad de los cultivos sin degradación de la base de los recursos del agroecosistema es necesario un acceso continuo a la mayor variabilidad genética posible disponible para un cultivo y las especies silvestres relacionadas con él.

Para conservar *ex situ* germoplasma de cultivos de propagación agámica se utilizan diversos métodos según las condiciones ambientales y los medios y conocimientos disponibles. En estos cultivos es conveniente utilizar una combinación de técnicas de almacenamiento en lugar de depender de una sola. Entre las técnicas más utilizadas figuran los bancos de genes conservados en el campo, los de genes *in vitro* y la crioconservación. (Roca, 1994)

El cultivo de tejidos vegetales constituye una alternativa para la conservación del germoplasma de especies que son propagadas vegetativamente. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer los medios de cultivo de crecimiento mínimo para la conservación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta*), el boniato (*Ipomoea batata*), la malanga (*Xanthosoma* spp.) y el ñame (*Dioscorea alata*).

## Materiales y Métodos

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. En todos los experimentos se utilizaron 10 explantes por tratamiento y tres repeticiones.

### Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca

Se utilizó como medio basal el medio de cultivo "MS" (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa (20, 30 y 40g.L<sup>-1</sup>), 6 – BAP (0,02 mg.L<sup>-1</sup>), GA<sub>3</sub> (0,1 mg.L<sup>-1</sup>, ANA (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) y Manitol (10, 20 y 30 g.L<sup>-1</sup>)

Las evaluaciones se realizaron a los nueve meses de la implantación, teniendo en cuenta: altura (cm), número de hojas activas y porcentaje de recuperación.

### Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en la conservación *in vitro* del cv. 'Cautillo'

Para la conservación *in vitro* del material se realizó un estudio sobre diferentes concentraciones de sorbitol (10, 20 y 30 g.L<sup>-1</sup>), se utilizó como control el medio de cultivo utilizado para la multiplicación del boniato.

Las evaluaciones se realizaron a los nueve meses de la implantación, teniendo en cuenta:

- Supervivencia
- Tallos.planta<sup>-1</sup>
- Altura (cm)
- Número de hojas activas
- Número de entrenudos.planta<sup>-1</sup>
- Número de raíces activas

Los datos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza de clasificación simple (completamente al azar) y la comparación múltiple de media se realizó según Tukey cuando se encontró homogeneidad de varianza, en los casos contrarios se aplicó Kruskal Wallis con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

## Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma spp.*)

Como material vegetal se utilizó el clon de Malanga *Xanthosoma* 'INIVIT MX – 2008'.

Para la conservación en medio de cultivo de crecimiento mínimo se utilizó el medio basal MS y se estudiaron 15 tratamientos que combinaron concentraciones de Manitol (regulador osmótico) (1,5; 3 y 4%) y Nitrato de plata (inhibidor de etileno) (0, 2, 4, 8, 10 mg.L<sup>-1</sup>).

A los 9 meses de cultivo se evaluaron: altura de la planta, número de brotes, número de hojas activas y número de raíces y los brotes fueron subcultivados a medio de proliferación de malanga para verificar su regeneración en plantas normales. Los resultados obtenidos fueron analizados por mediante análisis de varianza de clasificación simple (completamente al azar) y la comparación múltiple de medias según Tukey (Lerch, 1977), en el caso de las variables continuas según Dunnett-C

### Conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata*

Como material vegetal se utilizaron cuatro clones de ñame (*Dioscorea alata*): 'Blanco o Pelú', 'Caballo', 'Cartagena' y 'Búfalo de agua'. Para el estudio de medios de cultivo se utilizaron cinco variantes de concentraciones de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y concentraciones de manitol en las combinaciones siguientes:

#### Tratamientos

- |                                    |                                   |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| I. 25 % de MS, 1,5 % de manitol    | IV. 50 % de MS, 0,75 % de manitol |
| II. 50 % de MS, 1,5 % de manitol   | V. 50 % de MS, 3,0 % de manitol.  |
| III. 100 % de MS, 1,5 % de manitol |                                   |

Se evaluó a los cinco y diez meses la longitud del explante y el número de brotes formados.

### Resultados y Discusión.

#### Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca

Por los resultados obtenidos en las diferentes combinaciones de medios de cultivo estudiadas para el clon 'Señorita' su conservación *in vitro* fue favorecida por el incremento de sacarosa hasta 40 g.L<sup>-1</sup> y no por el uso de manitol a las concentraciones utilizadas en el experimento. Referente a las demás variables estudiadas se pudo constatar que los mejores resultados corresponden también con los medios 4 y 8 sin diferencias significativas entre ellos y con el medio 9 suplementado con 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 10 g.L<sup>-1</sup> de manitol. El manitol redujo el crecimiento pero afectó también la recuperación del material conservado. (Tabla 1)

TABLA 1. Comportamiento de los explantes del clon 'Señorita' después de nueve meses de conservación *in vitro*.

Tratamiento	Clon 'Señorita'			Clon 'CEMSA 74-725'		
	Altura (cm)	# de hojas activas	% de recuperación	Altura (cm)	# de hojas activas	% de recuperación
Control. 20 g.L <sup>-1</sup> S	2.96b	2.63a	87.7	1,75c	1,83 cd	80,0
1. 20 g.L <sup>-1</sup> S +10 g.L <sup>-1</sup> M	1.68cd	0.18bc	82.1	1,72c	1,25 d	86,2
2. 20 g.L <sup>-1</sup> S +20 g.L <sup>-1</sup> M	1.81cd	0.00c	82.6	1,73c	0,58 d	78,5
3. 20 g.L <sup>-1</sup> S +30 g.L <sup>-1</sup> M	2.04bcd	0.90bc	78.8	1,66c	0,25 cd	92,5
4. 30 g.L <sup>-1</sup> S	5.38a	4.18a	95.7	4,62b	3,16 ab	96,7
5. 30 g.L <sup>-1</sup> S +10 g.L <sup>-1</sup> M	2.40bc	0.90bc	90.2	2,62c	0,91 cd	90,7
6. 30 g.L <sup>-1</sup> S+20	1.90bcd	0.63bc	90.9	2,25c	0,68 cd	80,0

g.L <sup>-1</sup> M							
7. 30 g.L <sup>-1</sup> S+30	1.54cde	0.00c	92.9	2,29c	0,33 cd	87,5	
g.L <sup>-1</sup> M							
<b>8. 40 g.L<sup>-1</sup> S</b>	<b>4.86a</b>	<b>3.72a</b>	<b>97.7</b>	<b>6,04a</b>	<b>4,16 a</b>	<b>96,6</b>	
9. 40 g.L <sup>-1</sup> S +10	6.04a	4.00a	93.7	3,70b	1,75 b	96,5	
g.L <sup>-1</sup> M							
10. 40 g.L <sup>-1</sup> S+20 g.L <sup>-1</sup> M	1.27de	1.00b	91.7	1,83c	1,66 c	86,4	
11. 40 g.L <sup>-1</sup> S+30 g.L <sup>-1</sup> Ma	0.77e	0.36bc	93.7	1,66c	0,50 d	90,6	
ES ±	0.13**	0.15**	$\chi^2= 2,45$	0,09	0,11	$\chi^2= 2,98$	
CV (%)	25	31		19 %	31 %		

Leyenda: S. Sacarosa; M. Manitol

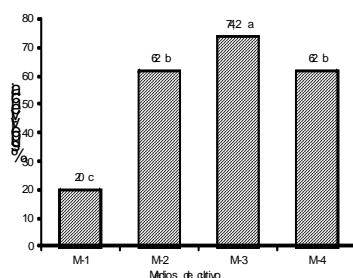
En el clon 'CEMSA 74-725' (Tabla 2) se obtuvo un comportamiento similar, a medida que se incrementó el contenido de sacarosa en el medio de cultivo se obtuvieron mejores resultados. La mejor recuperación de los explantes se alcanzó con los medios 4, 8 y 9 con valores de 96,7% para el primer medio de cultivo seguido por 96,5 % de recuperación para los dos restantes.

De forma integral el mejor medio de cultivo para la conservación *in vitro* de estos dos clones fue el suplementado con 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, sin manitol.

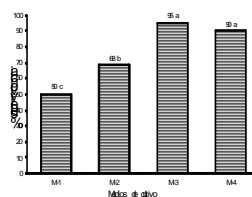
### Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en la conservación *in vitro* del boniato

Al adicionar al medio de cultivo 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol (M3) se obtuvo la mayor supervivencia (74.2%) de los explantes y la mejor recuperación (fig. 1A y B).

Al analizar el efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el medio de cultivo sobre la altura, se pudo apreciar que en el medio de cultivo suplementado con 20 g.L<sup>-1</sup> de glucosa y 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol (tabla 2), se observó una reducción considerable (4,58 cm) con respecto al medio de cultivo utilizado como control (10,25 cm), con diferencias altamente significativas. El sorbitol actúa como agente osmótico para aumentar la presión osmótica del medio reduciendo así la disponibilidad de los nutrientes para la plántula. La limitación del crecimiento por efecto de la concentración osmótica se debe a la reducción de la adsorción de agua y nutrientes del medio de cultivo (Acosta, 2005).



A



B

Rangos medios con letras no comunes difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para  $p < 0,05$ .

Leyenda:

M1. MS+ tiamina (2 mg.L<sup>-1</sup>) + mio-inositol (100 mg.L<sup>-1</sup>) + sacarosa (50 g.L<sup>-1</sup>) Control

- M2. MS+ tiamina (2 mg.L<sup>-1</sup>) + mio-inositol (100 mg.L<sup>-1</sup>) + glucosa (20 g.L<sup>-1</sup>) + Sorbitol (10 g.L<sup>-1</sup>).
- M3. MS+ tiamina (2 mg.L<sup>-1</sup>) + mio-inositol (100 mg.L<sup>-1</sup>) + glucosa (20 g.L<sup>-1</sup>) + Sorbitol (20 g.L<sup>-1</sup>).
- M4. MS+ tiamina (2 mg.L<sup>-1</sup>) + mio-inositol (100 mg.L<sup>-1</sup>) + glucosa (20 g.L<sup>-1</sup>) + Sorbitol (30 g.L<sup>-1</sup>).

Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de Sorbitol sobre: A. Porcentaje de supervivencia; B. Porcentaje de recuperación del material conservado

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en la conservación *in vitro* del boniato, a los nueve meses.

Medio de cultivo	Altura (cm)	Número de entrenudos	Tallos/Planta	Hojas activas	Raíces activas
M1 (Control)	10,25 c	20,04 a	1,41 a	0,87 c	5,04 c
M2	6,58 b	10,08 b	1,29 a	0,87 c	7,16 a
M3	4,58 a	8,72 b	1,37 a	5,04 a	7,25 a
M4	6,50 b	9,02 b	1,41 a	2,03 b	6,37 b
CV (%) =	0,14**	0,09**	0,02 ns	21,40	9,67
ES ±	10,30	13,40	15,24	0,06**	0,05**

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

Las plantas *in vitro* cuando se mantienen en medio de crecimiento mínimo, forman hojas pequeñas, característica que evidencia la presencia de condiciones idóneas para la conservación *in vitro*. Si las comparamos con plantas creciendo en medio de cultivo de crecimiento, podemos notar la diferencia en cuanto al tamaño y la cantidad de hojas.

El sorbitol (4 g.L<sup>-1</sup>) ha sido utilizado en la conservación de 4225 accesiones de papa por favorecer la reducción del crecimiento y prolongar el período entre subcultivos (Toledo y Golmirzaie, 1998).

### Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma spp.*)

Al evaluar los explantes conservados durante nueve meses pudimos apreciar que se encontraban en muy buenas condiciones y existía poco crecimiento, los tratamientos con 4% de manitol (XI - XV) alcanzaron las menores alturas y los mayores números de brotes de las plantas formadas *in vitro* sin diferencias estadísticas entre ellos. Tabla 3.

Al combinarla con 4 mg.L<sup>-1</sup> de Nitrato de plata se apreció el mayor número de hojas activas y el menor de hojas secas lo que demuestra su efecto como inhibidor del etileno y coincide con los resultados obtenidos por Mafla *et al.* (2002) al estudiar medios de crecimiento mínimo en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendt.).

Tabla No. 3. Respuesta de los explantes de malanga 'INIVIT MX – 2008' (*Xanthosoma spp.*) ante diferentes concentraciones de Manitol y Nitrato de plata.

Tratamientos	Variables evaluadas				
	Altura	No. Brotes	No. Raíces	No. hojas	Hojas secas
I. Man 1,5; AgNO <sub>3</sub> 0	3,38 a	1,55 b	7,33 a	7,66 ab	6,33 a
II. Man 1,5; AgNO <sub>3</sub> 2	2,85 ab	1,88 b	9,33 a	6,88 b	7,11 a
III. Man 1,5; AgNO <sub>3</sub> 4	2,37 abc	2,25 b	5,0 abc	6,75 b	4,50 abc
IV. Man 1,5; AgNO <sub>3</sub> 8	2,93 ab	2,40 b	10,90 a	6,50 b	7,90 a
V. Man 1,5; AgNO <sub>3</sub> 10	3,03 ab	2,70 b	9,80 a	5,70 b	9,50 a

VI. Man 3; AgNO <sub>3</sub> 0	1,91 bcd	7,71 ab	0,57 bc	12,00 ab	5,57 abc
VII. Man 3; AgNO <sub>3</sub> 2	1,55 cd	5,40 ab	5,10 ab	10,80 ab	5,10 abc
VIII. Man 3; AgNO <sub>3</sub> 4	1,80 cde	6,42 ab	7,85 a	11,57 ab	5,85 ab
IX. Man 3; AgNO <sub>3</sub> 8	1,37 cde	7,75 ab	10,50 a	16,12 a	4,25 abc
X. Man 3; AgNO <sub>3</sub> 10	1,66 cde	6,00 ab	9,33 a	10,22 ab	5,00 abc
XI. Man 4; AgNO <sub>3</sub> 0	1,25 cde	6,25 ab	3,50 abc	13,50 ab	4,25 abc
XII. Man 4; AgNO <sub>3</sub> 2	1,12 de	7,75 ab	1,75 abc	9,70 ab	0,50 bc
XIII. Man 4; AgNO <sub>3</sub> 4	1,43 cde	9,00 a	2,25 abc	14,50 ab	1,75 abc
XIV. Man 4; AgNO <sub>3</sub> 8	1,25 cde	3,00 ab	2,00 abc	9,00 ab	1,50 abc
XV. Man 4; AgNO <sub>3</sub> 10	0,70 e	5,50 ab	0,00 c	7,00 ab	0,00 c
ES ±	0,20**	0,93**	1,20**	1,63**	1,09**
CV(%)	24,95	51,37	47,55	44,40	53,61

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

Al aumentar la concentración de manitol disminuye la altura, aumenta el número de brotes, disminuye el número de raíces, aumenta el número de hojas activas y disminuye la muerte de las hojas. Las plantas propagadas a partir de estos medios se recuperaron exitosamente. La presencia de la mayor concentración de manitol en el medio de cultivo pudo haber influido en estos resultados ya que otros autores han informado que incrementa la supervivencia del material conservado durante el proceso de la recuperación. Rayas *et al.* (2008) en la conservación de *D. alata*, obtuvieron resultados similares, lo que demuestra la efectividad de estos compuestos para lo que concuerda con Espinosa *et al.* (1998) sobre la importancia de la supervivencia y recuperación de los materiales mantenidos *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento.

La osmolaridad del medio de cultivo puede ser disminuida sin causar problemas de toxicidad por la adición de Manitol a concentraciones alrededor de 0,2 Mol, causando considerables reducciones del crecimiento e incrementando la longevidad.

#### **Conservación *in vitro* de germoplasma de Dioscorea alata**

Transcurridos 10 meses pudimos apreciar que las plántulas se conservaron en buenas condiciones destacándose el tratamiento V (50 % de las sales y vitaminas MS, 3,0% de manitol, 20 g de sacarosa) con la menor altura promedio (3.16 cm) sin diferencias estadísticas entre los clones (Fig. 2A). El número de brotes mostró un comportamiento similar (Fig. 2B).

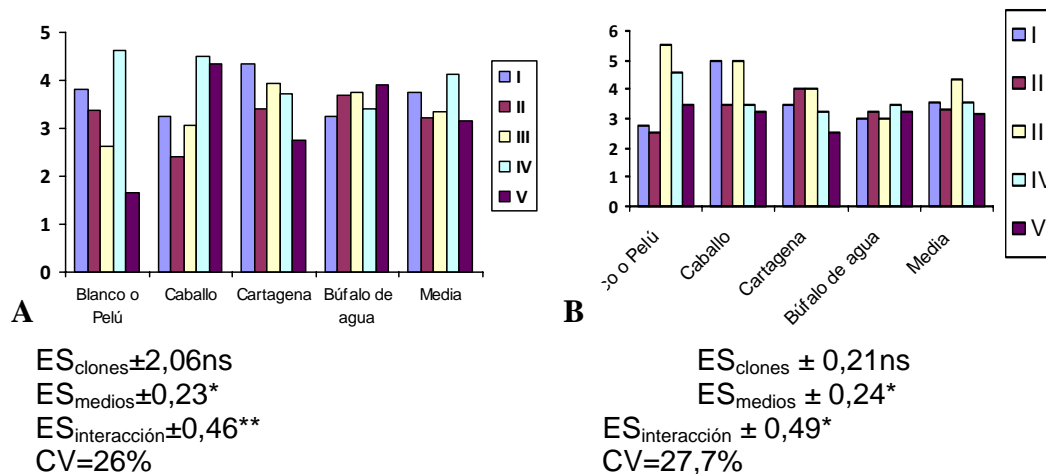


Figura 2. Respuesta de los explantes a los 10 meses de conservados. A. Longitud de la plántula, B. Número de brotes por planta.

La presencia de la mayor concentración de manitol en el medio de cultivo pudo haber influido en estos resultados ya que otros autores han reportado que incrementa la supervivencia del material conservado durante el proceso de la recuperación. Este efecto pudo ser favorecido por la presencia de carbón activado en el medio de cultivo de conservación que contribuyó a la viabilidad del tejido en esta fase que a su vez producía porcentaje más alto de recuperación del retoño en estos tratamientos. Mesa et al. (1995) caracterizaron la recuperación de órganos y plantas completas como un factor determinante para la micropropagación eficiente y/o en la conservación *in vitro*.

## Referencias

- Acosta Pérez, KI (2005). Conservación *in vitro* del híbrido 'IBP 42-99' de papaya (*Carica papaya* L.). Tesis presentada en opción al grado de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de Las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 64 p.
- Mafla, Graciela, JC Roa y DG Debouck. 2002. Efecto del ancymidol y el nitrato de plata sobre el crecimiento de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Sendt.) conservados *in vitro*. VIII Congreso Latinoamericano de Botánica y II Congreso Colombiano de Botánica, Cartagena, Colombia, 13-18 octubre 2002.
- Mesa AR, Lajonchere G & Toral O (1995) Micropropagación y conservación de germoplasma. Revista Pastos y Forrajes 18: 1–10
- Murashige, T y F Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Rayas, A; M Cabrera, V Gutiérrez, M García, J López, S Rodríguez, M Milián, V Medero, M Basail, A Santos, Y Torres, M Bauta, H. Toledo. 2008. Efecto del manitol sobre la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata*. XI Encuentro de Botánica "Johannes Bisse In Memoriam" a celebrarse en nuestro centro del 14 al 17 de noviembre del año 2008. CD memorias, ISBN. 978-959-18-0395-5.
- Roca, W (1994). Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, 63 p.
- Toledo, J y A Golmirzaie (1998). Conservación *in vitro* de *Solanum* spp. bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Libro Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Palacio de Convenciones. La Habana. Cuba