

ESTABLECIMIENTO *In Vitro* DE ÁPICES DE MALANGA (*Xanthosoma sagittifolium* Schott)

Arlene Rodríguez[✉], S. Quintero, Ana J. Rodríguez y Zoila Fundora

ABSTRACT. The *in vitro* establishment of taro (*Xanthosoma* spp.) is frequently affected by microorganisms, which can provoke delays of vitroplantlet production. The objective of this paper was to establish saprophyte microorganism-free taro *in vitro* cultural conditions, as well as the most effective culture medium for establishing taro from virus-free apex. Therefore, a superficial bud disinfection with sodium hypochlorite as well as a treatment with Oxitetracyclin and Eritromycin for a week was performed in the culture medium. Six culture media were compared with the commonly used check at taro initiation. The best medium was that with BAP 1 mg.L⁻¹, IBA 0.3 mg.L⁻¹, silver nitrate 5 mg.L⁻¹ and sodium tiosulphate 5 mg.L⁻¹, which induced 65.2 % multiplication increase, compared to the check.

Key words: *Xanthosoma sagittifolium*, *in vitro* culture, plant protection

RESUMEN. El establecimiento *in vitro* de malanga (*Xanthosoma* spp.) es frecuentemente afectado por microorganismos, lo que puede provocar atrasos en la producción de vitroplántulas. El objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de la malanga, libre de microorganismos saprófitos, así como el medio de cultivo más efectivo para su establecimiento a partir de ápices libres de virus. Se realizó para ello una desinfección superficial de las yemas con hipoclorito de sodio y un tratamiento en el medio de cultivo con Oxitetraciclina y Eritromicina durante una semana. Se compararon seis medios de cultivo con el testigo comúnmente usado en la iniciación de la malanga. El mejor resultado se obtuvo con la adición de BAP 1 mg.L⁻¹, IBA 0.3 mg.L⁻¹, nitrato de plata 5 mg.L⁻¹ y tiosulfato de sodio 5 mg.L⁻¹, que indujo un incremento en la multiplicación de un 65.2 % por encima del testigo.

Palabras clave: *Xanthosoma sagittifolium*, cultivo *in vitro*, protección de las plantas

INTRODUCCIÓN

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 (1, 2, 3, 4) En la malanga, la mayoría de los protocolos de iniciación comienzan a partir de meristemos, al igual que en muchos otros cultivos (5, 6).

Se conocen las grandes pérdidas que se producen al tratar de multiplicar algunas especies vegetales y se ha planteado que dichas pérdidas por contaminaciones *in vitro* pueden oscilar entre 3 y 15 % en la mayoría de los subcultivos, tanto en las producciones comerciales como en las investigaciones científicas (7, 8).

Con el fin de detectar los contaminantes *in vitro*, se usa el indexado en las diferentes fases del cultivo. Para ello se utilizan segmentos de cada explante y se cultivan en medios bacteriológicos, para detectar rápidamente la

presencia de bacterias contaminantes y eliminar los explantes contaminados (9, 10). Sin embargo, cuando la totalidad de los explantes se encuentran contaminados con bacterias endófitas, se hace necesario buscar métodos efectivos para eliminar la contaminación del tejido vegetal y evitar así pérdidas, tanto de reactivos como de genotipos valiosos.

En el caso de los medios de cultivo, estos constituyen un factor importante en la competencia por la nutrición, que se establece entre los tejidos que se cultivan y los posibles contaminantes endófitos, y en muchas ocasiones se requiere agregar al medio componentes que eliminen o inhiban su crecimiento, por lo perjudiciales que estos resultan (11).

El objetivo de este trabajo fue obtener un protocolo eficiente para el establecimiento *in vitro* de ápices de malanga libres de microorganismos endófitos, así como el medio de cultivo más efectivo para su desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron yemas apicales de malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.) clon 'Viequera', libres de virus (12). Se tomaron secciones de aproximadamente 4 cm de largo, las cuales se lavaron con agua corriente, se trataron con una solución de detergente comercial al 1 % durante 10 min. y se enjuagaron con agua corriente.

Dra.C. Arlene Rodríguez, Investigador Auxiliar y S. Quintero, Investigador Titular, ambos de la Dirección de Agricultura Sostenible; Ana J. Rodríguez, Investigador Auxiliar de la Dirección de Biotecnología y Dra.C. Zoila Fundora, Investigador Titular de la Dirección de Genética, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical «Alejandro de Humboldt» (INIFAT). Calle 1 esq. 2, Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba

✉ asdir@inifat.esihabana.cu

Después se realizó la desinfección superficial de las secciones con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 20 min. y se enjuagaron tres veces con agua corriente.

En el flujo de aire laminar se eliminaron 1.5 cm del pseudotallo de las yemas y 3-4 mm de la parte basal. La sección restante, de unos 2 cm de largo, se cortó de modo que formara un cubo de aproximadamente 2 x 1 x 1 cm, en el que la yema apical quedó en el centro.

Las yemas se sumergieron en etanol al 70 % durante 1 min, después se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 5 min. y se lavaron con agua destilada estéril, para eliminar tejido del explante hasta obtener un tamaño de 5 x 8 mm. Posterior a la desinfección, las yemas se colocaron en tubos de ensayo con soporte de papel de filtro, con 5 mL de medio líquido, compuesto por las sales y vitaminas de MS (13), suplementado con 6-Bencilaminopurina (BAP) 0.1 mg.L⁻¹ (14) y agregándole Oxitetraclina 30 mg.L⁻¹, Eritromicina 40 mg.L⁻¹ y azúcar refino 30 g.L⁻¹. Como testigo se empleó el mismo medio de cultivo pero sin antibióticos (10).

Los antibióticos utilizados se seleccionaron a partir de los antibiogramas realizados a explantes contaminados con bacterias.

Los cultivos se mantuvieron a la temperatura de 26 ±1°C y en la oscuridad durante siete días. Después se transplantaron y se mantuvieron a igual temperatura, pero con una iluminación de 3 000 a 5000 lux, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad en los siguientes seis medios de cultivo:

- ♦ M1 MS + 0.1 mg.L⁻¹ de BAP
- ♦ M2 MS + 0.1 mg.L⁻¹ de BAP + 5 mg.L⁻¹ de AgNO₃ + 5 mg.L⁻¹ de tiosulfato de sodio
- ♦ M3 MS + 1 mg.L⁻¹ de BAP + 0.3 mg.L⁻¹ de IBA (ácido indol butírico)
- ♦ M4 MS + 1 mg.L⁻¹ de BAP + 0.3 mg.L⁻¹ de IBA + 5 mg.L⁻¹ de AgNO₃ + 5 mg.L⁻¹ de tiosulfato de sodio
- ♦ M5 MS + 2 mg.L⁻¹ de BAP + 0.3 mg.L⁻¹ de IBA
- ♦ M6 MS + 2 mg.L⁻¹ de BAP + 0.3 mg.L⁻¹ de IBA + 5 mg.L⁻¹ de AgNO₃ + 5 mg.L⁻¹ de tiosulfato de sodio

En cada medio se implantaron 24 ápices (uno en cada tubo) y a los 28 días se evaluaron el largo de los ápices (LA), ancho de los ápices (AA), número de hojas totales (HT), índice de multiplicación (E) y número de yemas (Y), así como las contaminaciones bacterianas.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza siguiendo un diseño completamente aleatorizado. Se compararon las medias utilizando la prueba de comparación múltiple de Neuman-Keuls.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las contaminaciones con microorganismos que se presentaron durante la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott), clon 'Viequera', fueron eliminadas cuando los ápices se colocaron en el medio de Salazar (14) suplementado con Oxitetraclina y

Eritromicina durante una semana. De todos los ápices iniciados con este tratamiento, ninguno presentó contaminación bacteriana a los 28 días. Sin embargo, los ápices utilizados como testigos en el medio de cultivo sin antibióticos presentó la totalidad de los explantes contaminados con bacterias, demostrándose la importancia del empleo de los antibióticos en la eliminación de las contaminaciones endógenas en las aráceas, lo que coincide con otros resultados (9, 15).

Después de seleccionado el explante y realizada la desinfección superficial con hipoclorito de sodio, no se eliminaron las contaminaciones producidas por microorganismos saprófitos, ya que éstas resultan muy difíciles de quitar y los procedimientos empleados para su eliminación no son satisfactorios en muchas ocasiones (9, 16, 17). Sin embargo, en este trabajo el procedimiento y los antibióticos utilizados fueron eficientes en la eliminación de las contaminaciones endógenas, lo que evita la pérdida de materiales genéticos valiosos, así como contar con una metodología para poder utilizar en la propagación de plantas vacunadas con una estirpe menos severa del *Dasheen mosaic (poty)virus* (DMV-B) que protege a las plantas contra la estirpe más severa del virus (DMV-S) (18).

En la mayoría de los trabajos de iniciación en la malanga, se utilizan meristemas, pero el porcentaje de éxito siempre está limitado por las dificultades de esta técnica; de ahí la importancia de establecer una metodología eficiente a partir de ápices cuando se parte de "semilla" libre de virus o vacunada.

Al transplantar los ápices a un medio sin antibióticos y con variadas concentraciones hormonales, el vigor y el desarrollo de los ápices fueron superiores. En la Tabla I se puede observar el análisis de los resultados al comparar los seis medios de cultivo. Se encontraron diferencias significativas para el largo del ápice, el ancho del ápice, el número de yemas y el índice de multiplicación.

Tabla I. Influencia de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento de los ápices

Fuentes	GL	LA	AA	IM	Y
Tratamientos	5	3.66**	0.17***	3.3**	0.75*
Error	42	1.3	0.04	1.33	0.32
CV		32.2 %	21.0 %	31.1 %	93.1 %
X		2.79	0.83	2.85	2.50
Significación		1 %	0.1 %	1 %	5 %

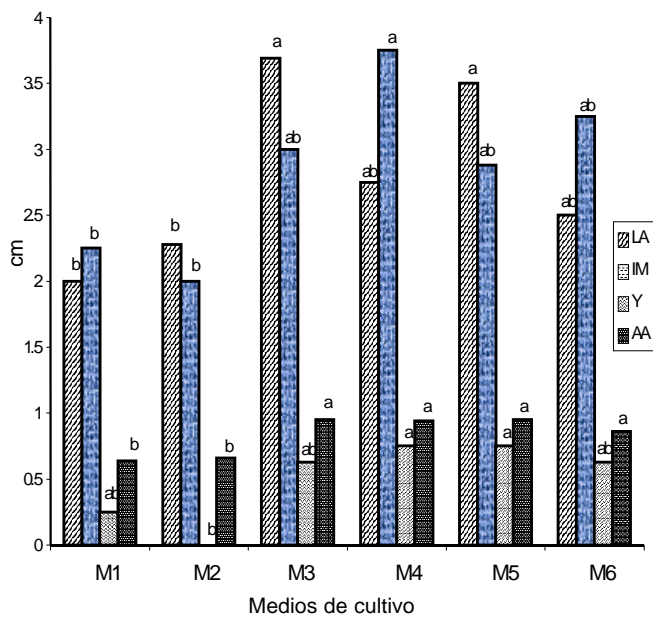
LA: largo de los ápices

AA: ancho de los ápices

IM: índice de multiplicación

Y: número de yemas

En la Figura 1 se muestra cómo los medios M3, M4, M5 y M6 presentaron diferencias significativas en el índice de multiplicación respecto al medio control (M1) y al medio M2. Con esto se demuestra que para el tamaño utilizado de los ápices, no es factible la concentración de 0.1 mg.L⁻¹ BAP y tampoco cuando esta se combina con la solución de AgNO₃ y Tiosulfato de Na (AgT).



LA: Largo de los ápices
IM: Índice de multiplicación
Y: número de yemas
AA: Ancho de los ápices

Figura 1. Influencia de los medios de cultivo en el desarrollo de los ápices

Las combinaciones utilizadas (BAP 1 mg.L⁻¹, IBA 0.3 mg.L⁻¹ y BAP 2 mg.L⁻¹, IBA 0.3 mg.L⁻¹) muestran un buen comportamiento cuando se emplearon solas y también cuando se combinaron con la solución de AgT, a diferencia de los resultados obtenidos en los medios que contenían BAP 0.1 mg.L⁻¹.

Aunque entre los cuatro medios (M3, M4, M5 y M6) no existen diferencias significativas para las variables evaluadas, es importante destacar que los medios M4 y M6 mostraron valores superiores en el índice de multiplicación, mayor crecimiento de los explantes y un verde más intenso de las hojas, cuando se compara con los medios M3 y M5 que no contienen la solución de AgT.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar entre los medios M4 y M6 el que menor concentración de BAP posee, lo que permite reducir los riesgos de variación somaclonal por exceso de esta hormona y al mismo tiempo obtener un porcentaje de proliferación mayor.

El mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento resultó el MS suplementado con BAP 1 mg.L⁻¹, IBA 0.3 mg.L⁻¹, nitrato de plata 5 mg.L⁻¹ y tiosulfato de sodio 5 mg.L⁻¹ (M4), ya que el índice de multiplicación (con una media de 3.8 explantes) representa un 72.7 % de producción por encima del medio MS suplementado con BAP 0.1 mg.L⁻¹ (M1) comúnmente usado en la iniciación de malanga, tratamiento que estuvo entre los de menor índice de multiplicación (2.2), al igual que el MS suplementado con BAP 0.1 mg.L⁻¹, nitrato de plata 5 mg.L⁻¹ de y tiosulfato de sodio 5 mg.L⁻¹ (M2), con una proliferación de dos explantes.

Los medios M4 y M6, que tuvieron un rendimiento de un 65.2 y un 43.5 % respectivamente por encima del control, presentaban mayor vigor y coloración verde más

intenso, lo que pone de manifiesto no solo el efecto biocida del nitrato de plata sino también un efecto estimulante ya que unido al tiosulfato de sodio actúa como un sistema de óxido-reducción que favorece la formación de nitratos-nitritos y sulfatos-sulfitos. Estos mecanismos intervienen en los procesos de división-maduración celular, así como en la síntesis de aminoácidos, de ahí la importancia de su modificación.

Con esta metodología utilizada es posible, a partir de "semilla" libre de virus o plantas vacunadas contra la estirpe más severa del *Dasheen mosaic (poty)virus* (DMV-S), comenzar la iniciación *in vitro* con ápices y no a partir de meristemos que es más laboriosa, requiere de más tiempo y hay que combinarla también con otras técnicas como la termoterapia, electroterapia y otras, para lograr la erradicación de los virus que tanto afectan a las aráceas (19). También es importante la eliminación de los microorganismos endofitos, acortar la fase de iniciación y obtener mayor índice de multiplicación.

CONCLUSIONES

- La desinfección de los ápices fue completamente eficiente cuando estos se trataron superficialmente con hipoclorito de sodio al 5 %/20 min. y se cultivaron en un medio con Oxitetraciclina 40 mg.L⁻¹ y Eritromicina 30 mg.L⁻¹ a la oscuridad durante una semana.
- Los medios de cultivo que contenían nitrato de plata y tiosulfato de sodio mantuvieron la asepsia e indujeron un incremento en el número de explantes.
- El mejor medio para el establecimiento del cultivo de ápices de malanga en las condiciones experimentales descritas fue el medio MS suplementado con BAP 1 mg.L⁻¹, AIB 0.3 mg.L⁻¹, AgNO₃ 5 mg.L⁻¹ y Tiosulfato de sodio 5 mg.L⁻¹ (M4). Los medios M3 y M6 también indujeron un mayor incremento que el medio convencional (M1).

REFERENCIAS

1. Ashmore, S. E. Current *in vitro* conservation techniques. En: Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. 1997. p. 5-17.
2. García, M.; Rodríguez, S.; Mederos, V.; Milián, M.; López, J.; Ventura, J.; Cabrera, M.; Rayas, A.; Gálvez, D.; Guerra, D.; Toledo, H. y Gálvez, J. R. Conservación *in vitro* de germoplasma de malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta* (L.) Schott. Resúmenes. En: Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. BioVeg/99. (1999:Ciego de Ávila).
3. García, M.; Mederos, V.; Rodríguez, S.; López, J.; Ventura, J.; Cabrera, M.; Rayas, A.; Hernández, R.; González, J. E.; Bermúdez, D.; Gálvez, D.; Gutiérrez, V. J. y Gálvez, R. Generalización de la tecnología de micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. Resúmenes. En: Convención Trópico/99 (Agricultura Tropical). (1999:La Habana), *Palacio de las Convenciones de La Habana*, p. 360-361.

4. Rani, V. y Raina, S. N. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: A critical Reappraisal. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2000, vol. 36, no. 5, p. 319-330.
5. Mederos, V.; García, M.; Cabrera, O.; López, J.; Ventura, J. de la C.; Gálvez, D. y Álvarez, M. Optimización de la tecnología de micropropagación de la malanga. *Avances en Biotec. Mod.*, 1995, vol. 3, p. II-18.
6. Torres, A. C.; Lopes-Teixeira, S. y Poseer, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas libres de vírus. En: *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília:EMBRAPA. CBAB, 1998. p. 133-145.
7. Leifert, C.; Morris, C. E. y Waites, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: Reasons for contamination. *Problems In Vitro. Critical Reviews in Plants Science*, 1994, vol. 13, no. 2, p. 139-183.
8. Leifert, C. y Woodward, S. Laboratory contamination management, the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1998, vol. 52, p. 85-88.
9. González, R.; Borrás, O.; Concepción, O.; Trujillo, R.; Bruzon, M.; Cid, M.; Nápoles, L. y Recio, M. I. Evaluación de diferentes técnicas para el control de las contaminaciones en el cultivo de tejidos de plantas. *Téc. de avanzada aplicada a la propagación de las plantas*. En: *Taller Internacional de Biotecnología Vegetal*. BIOVEG' 97. (1997:La Habana). p. 27.
10. Brinks, T. Yams (*Dioscorea* spp.). Application of Biotechnology in Selected Crops. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. Eschborn, Germany, 2000, p. 115-120.
11. Alloufa M. I. A.; C. S. Rossiter; D.N. Medeiros y P. H. Rodríguez. Influence of several antibiotic concentrations on morphogenic response of *Hancornia speciosa* explants *in vitro*. Resúmenes. En: *Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal*. (3:1998:La Habana). 1998. 12 p.
12. Quintero-Fernández, S.; Rodríguez-Nodals, A.; Rodríguez-Manzano, A.; Maribona, R. H.; López, M.; Pérez, S.; Cala, M.; Proenza, M.; Rodríguez, A. J.; Fundora, Z.; Peralta, E. L.; Olivera, H.; Pérez, D.; Pérez, O.; Morales, N.; Mojena, D. y Socorro, A. Recuperación del cultivo de la malanga (*Xanthosoma* spp.) mediante procedimientos biotecnológicos. En: *Convención Trópico/99 (Agricultura Tropical)* PSM. Soft Cal. No 16, 1999.
13. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
14. Salazar, S. Micropropagación de aráceas comestibles. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali:CIAT. 1991, p. 469-479.
15. Hernández, G.; Vento, H. y Llano, Y. C. 1998. Control de la contaminación endógena en aráceas comestibles mediante el empleo de antibióticos. *Programa y Resúmenes*. En: *Seminario Científico*. INCA. (11:1998 nov. 17-20:La Habana). p. 15.
16. George, E. F. Controlling persistent contaminants and plant diseases. En: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. The technology. 2nd. Ed., 1993. p. 130-150.
17. Leifert, C. y Cassells, C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 200, vol. 137, no. 2, p. 133-138.
18. Quintero, S.; Rodríguez-Nodals, A. y Rodríguez-Manzano, A. Malanga vacunada contra el Dasheen mosaic (poty)virus. The American Phytopathological Society Meetings. Disponible en: <<http://www.apsnet.org/meetings/div/cro1abs.asp>>.
19. Ivancic and Lebot. The genetics and breeding of taro. CIRAD. Publications Services, 2000. 194 p.

Recibido: 17 de mayo del 2002

Aceptado: 13 de marzo del 2003