

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

Mannitol and silver nitrate effect of taro (*Xanthosoma* spp.) *in vitro* conservation

Aymé Rayas^{**}, Manuel Cabrera^{*}, Arletys Santos^{*}, Milagros Basail^{*}, Jorge López^{*}, Víctor Medero^{*}, Yoel Beovides^{*}

Resumen

El mantenimiento en campo de los Bancos de Germoplasma resulta muy costoso, además de los riesgos a que se exponen. El cultivo de tejidos constituye una solución a estos problemas siendo conveniente utilizar una combinación de técnicas de almacenamiento en los cultivos de propagación vegetativa para no depender de una sola. El cultivo *in vitro* ofrece nuevas alternativas para el mejoramiento de la productividad y la producción de material de siembra sano en malanga (*Xanthosoma* spp.). La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba, con el objetivo de estudiar las condiciones para la conservación en crecimiento mínimo *in vitro* de germoplasma de esta especie. Como material vegetal se utilizó el clon de Malanga *Xanthosoma* 'INIVIT MX-2008'. El establecimiento del material vegetal y su posterior multiplicación fueron realizadas según la metodología recomendada por García *et al.* (1999). 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 la acción etileno) (0, 2, 4, 8, 10 mg.L⁻¹). Se concluye que es posible conservar *in vitro* los recursos genéticos de malanga *Xanthosoma* durante más de 10 meses, en un medio de cultivo compuesto por sales y vitaminas MS suplementado con 4% de manitol y 4 mg.L⁻¹ de Nitrato de plata. Las plantas propagadas a partir de este medio de cultivo se recuperaron exitosamente. La mayor concentración de manitol en el medio de cultivo pudo haber influido en la mejor recuperación del material conservado.

Palabras clave: Crecimiento mínimo, conservación de recursos genéticos.

Abstract

Maintenance field genebanks are costly, in addition to the risks they face; to that effect on tissue culture is a solution to these problems. In vegetative propagated crops is desirable to use a combination of storage technology rather than relying on just one. *In vitro* culture provides an alternative for improving productivity and production of healthy planting material of taro (*Xanthosoma* spp.). This research was conducted in the Tissue Culture Laboratory of the Research Institute of Tropical Crops. Our objective was study the conditions for minimal growth conservation *in vitro* germplasm in this species. As plant material was used clone of Taro *Xanthosoma* 'INIVIT MX-2008'. The establishment of the plant material and its subsequent multiplication were carried out according to the methodology recommended by García *et al.* (1999). For the maintenance in culture of minimal growth basal medium MS was used and studied 15 treatments with combined concentrations of mannitol (osmotic regulator) (1.5, 3 and 4%) and silver nitrate (Ethylene inhibitor) (0, 2, 4, 8, 10 mg.L⁻¹). It concludes that it is possible to conserve taro *Xanthosoma* genetic resources *in vitro*, for over 10 months in a culture medium composed of MS salts and vitamins and supplemented with 4% mannitol and 4 mg.L⁻¹ of silver nitrate. Plants propagated from this

* Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara, CP 53000. email: arayas@inivit.cu

culture medium were recovered successfully. The presence of higher concentrations of mannitol, may have influenced that increases survival of preserved material.

Keys words: minimal growth, genetic resources conservation.

Recibido: junio 7 de 2012

Aprobado: junio 24 de 2013

Introducción

La malanga, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, es una planta perenne de los trópicos y zonas húmedas perteneciente a la familia de las Aráceas y consumida por el hombre desde tiempos remotos por el alto valor nutritivo de sus cormos. Comúnmente se reproducen de forma vegetativa y una de las principales limitantes del cultivo es la carencia de semilla de alta calidad (Matehus *et al.*, 2006).

Los recursos genéticos vegetales para la agricultura y la alimentación son la base para la seguridad agroalimentaria mundial, por lo que se han iniciado programas de conservación y se han establecido bancos de genes con el objetivo de coleccionar y mantener la diversidad genética, para satisfacer las necesidades continuas de diferentes usuarios (Kameswara, 2004).

La estrategia de conservación incluye conservación *in situ* y *ex situ*, esta última incluye técnicas específicas como el almacenamiento de semillas, bancos de germoplasma en campo, bancos de cultivo *in vitro*, bancos de ADN, bancos de polen y jardines botánicos cada una con sus ventajas y limitaciones (Engels and Wood, 1999).

Las especies vegetales que producen semillas recalcitrantes o no producen semillas y por tanto se propagan de forma vegetativa se conservan tradicionalmente en colecciones en campo. Este método presenta grandes desventajas como la exposición a desastres naturales, ataques por plagas y patógenos y un alto costo de mantenimiento que limitan su eficacia y amenazan la seguridad de los recursos genéticos conservados de esta forma (Whiters and Engels, 1990).

Las técnicas modernas de producción de variedades mejoradas altamente homogéneas han provocado la reducción de la variabilidad genética de las especies cultivadas, ocasionando una erosión genética, es decir, la pérdida de la plasticidad en la respuesta del genoma frente a las alteraciones ambientales, siendo necesario recurrir a fuentes genéticas originales de la variabilidad que en consecuencia se deben conservar adecuadamente.

Conociendo estas razones existe una alternativa viable, y más satisfactoria que las técnicas tradicionales para especies propagadas vegetativamente, que es la preservación de germoplasma *in vitro*. Esta ofrece nuevas estrategias para el mejoramiento de la productividad y la producción de material de siembra sano de malanga (*Xanthosoma* spp.) (Salazar, 1991; García *et al.*, 1999 y Montaldo *et al.*, 2004).

Son numerosas las sustancias que han sido empleadas en los medios de cultivo para reducir el ritmo de crecimiento de las plantas, entre las que pueden citarse el Manitol, Sorbitol, Ácido Salicílico y otras (López-Delgado y Scott, 1998), sin embargo, tanto la sustancia como su concentración, estarán en dependencia de la especie y dentro de éstas, los genotipos a conservar, por lo que resulta de gran importancia probar en cada laboratorio cuál es la sustancia idónea, y qué dosis emplear para lograr los mejores resultados (Castillo *et al.*, 2008).

Watt *et al.* (2000) consideran que el crecimiento mínimo de cultivos *in vitro* puede ser alcanzado por cambios en el potencial osmótico de las células en cultivo. El potencial osmótico del medio de cultivo tiene efecto directo en los explantes, conforme sea más negativo, menor será la adsorción de agua y por consecuencia habrá una baja disponibilidad de nutrientes (Uribe, 2010). Rayas *et al.* (2002) plantearon que el manitol redujo el crecimiento de las plantas *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta*), aunque observaron una afectación en la recuperación del material vegetal conservado.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las condiciones óptimas para la conservación en crecimiento mínimo *in vitro* de germoplasma la malanga (*Xanthosoma* spp.).

Materiales y métodos

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), en Villa Clara, Cuba. Como material vegetal se utilizó el clon de Malanga *Xanthosoma* 'INIVIT MX - 2008'. Los cormos de malanga fueron sometidos a desinfección super-

ficial con detergente, alcohol (70%) e hipoclorito de sodio (2,5%). Para el establecimiento *in vitro*, los meristemas fueron cultivados en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 3% sacarosa y concentraciones hormonales de 0,1 mg.L⁻¹ de 6-bencil aminopurina (BAP) por 21 días.

Para la proliferación de brotes se colocaron los ápices establecidos en medio de cultivo que contiene sales y vitaminas de MS, 3% sacarosa, 3 mg.L⁻¹ de BAP, 1 mg.L⁻¹ de Ácido Indolacético (AIA), 0,1g.L⁻¹ de Mio-inisitol y solidificado con agar. Las condiciones de crecimiento durante todo el proceso fueron 26±2°C y fotoperíodo de 16:8 (Oscuridad:luz).

Los brotes en tercer subcultivo se colocaron en medio de cultivo de crecimiento mínimo constituido por sales y vitaminas MS y se estudiaron 15 tratamientos que combinaron concentraciones de Manitol (regulador osmótico) (1,5; 3 y 4%) y Nitrato de plata (inhibidor de la acción del etileno (Taiz y Zeiger, 2006)) (0, 2, 4, 8, 10 mg.L⁻¹) como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Combinaciones de Manitol y Nitrato de plata utilizadas para determinar las condiciones de crecimiento mínimo.

| Tratamiento | Concentración de manitol (%) | Concentración de AgNO ₃ (mg.L ⁻¹) |
|-------------|------------------------------|--|
| I | 1,5 | 0 |
| II | 1,5 | 2 |
| III | 1,5 | 4 |
| IV | 1,5 | 8 |
| V | 1,5 | 10 |
| VI | 3 | 0 |
| VII | 3 | 2 |
| VIII | 3 | 4 |
| IX | 3 | 8 |
| X | 3 | 10 |
| XI | 4 | 0 |
| XII | 4 | 2 |
| XIII | 4 | 4 |
| XIV | 4 | 8 |
| XV | 4 | 10 |

Tabla 2. Respuesta de los explantes de malanga ‘INIVIT MX – 2008’ (*Xanthosoma* spp.) ante diferentes concentraciones de Manitol y Nitrato de plata.

| Tratamientos | Variables evaluadas | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|
| | Altura (cm) | No. Brotes (u) | No. Raíces (u) | No. hojas (u) | Hojas secas (u) |
| I. Man 1,5; AgNO ₃ 0 | 3,38 a | 1,55 b | 7,33 a | 7,66 ab | 6,33 a |
| II. Man 1,5; AgNO ₃ 2 | 2,85 ab | 1,88 b | 9,33 a | 6,88 b | 7,11 a |
| III. Man 1,5; AgNO ₃ 4 | 2,37 abc | 2,25 b | 5,00 abc | 6,75 b | 4,50 abc |
| IV. Man 1,5; AgNO ₃ 8 | 2,93 ab | 2,40 b | 10,90 a | 6,50 b | 7,90 a |
| V. Man 1,5; AgNO ₃ 10 | 3,03 ab | 2,70 b | 9,80 a | 5,70 b | 9,50 a |
| VI. Man 3; AgNO ₃ 0 | 1,91 bcd | 7,71 ab | 0,57 bc | 12,00 ab | 5,57 abc |
| VII. Man 3; AgNO ₃ 2 | 1,55 cd | 5,40 ab | 5,10 ab | 10,80 ab | 5,10 abc |
| VIII. Man 3; AgNO ₃ 4 | 1,80 cde | 6,42 ab | 7,85 a | 11,57 ab | 5,85 ab |
| IX. Man 3; AgNO ₃ 8 | 1,37 cde | 7,75 ab | 10,50 a | 16,12 a | 4,25 abc |
| X. Man 3; AgNO ₃ 10 | 1,66 cde | 6,00 ab | 9,33 a | 10,22 ab | 5,00 abc |
| XI. Man 4; AgNO ₃ 0 | 1,25 cde | 6,25 ab | 3,50 abc | 13,50 ab | 4,25 abc |
| XII. Man 4; AgNO ₃ 2 | 1,12 de | 7,75 ab | 1,75 abc | 9,70 ab | 0,50 bc |
| XIII. Man 4; AgNO ₃ 4 | 1,43 cde | 9,00 a | 2,25 abc | 14,50 ab | 1,75 abc |
| XIV. Man 4; AgNO ₃ 8 | 1,25 cde | 3,00 ab | 2,00 abc | 9,00 ab | 1,50 abc |
| XV. Man 4; AgNO ₃ 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 sin letras en común difieren significativamente para P< 0,05

A los 9 meses de cultivo se evaluaron: altura de la planta, número de brotes, número de hojas activas, número de raíces y número de hojas muertas y los brotes fueron subcultivados a medio de proliferación de malanga para verificar su regeneración en plantas normales. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis estadístico de varianza simple y se empleó la prueba de Tukey.

Resultados y discusión

Al evaluar las plantas conservadas *in vitro* 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*, no hubo diferencias estadísticas entre ellos (tabla 2).

Al combinarla con 4 mg.L⁻¹ 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.).

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 sostienen que incrementa la supervivencia del material conservado durante el proceso de la recuperación. Rayas *et al.* (2008) en la conservación de *Dioscorea alata*, alcanzaron crecimiento lento de las plántulas, lo que demuestra la efectividad de estos compuestos y concuerda además con Espinosa *et al.* (2003) quien resalta la importancia de la supervivencia y recuperación de los materiales mantenidos *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento.

En otras especies de plantas también se ha referido el uso de manitol combinado con otros factores como la temperatura para la conservación *in vitro*. Por ejemplo, García *et al.* (1999) lograron mantener *in vitro* hasta 12 meses diferentes clones de malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia sculenta*) en medio de cultivo basal MS con distintas concentraciones de manitol, BA y sacarina sin deterioro fisiológico del material vegetal. Roca (1994) conservaron *in vitro* yemas de yuca (*Manihot esculenta*), sin perder su viabilidad durante 18 meses

a la temperatura comprendida entre 22 y 24°C. García-Águila *et al.* (2007) conservaron ápices de papaya (*Carica papaya*) procedentes de embriones somáticos cultivados *in vitro* en el medio de cultivo MS con la adición de manitol (0; 0.5; 1; 2 y 3%), donde observaron la existencia de una tendencia a disminuir la capacidad de crecimiento y morfogénesis de los explantes en la medida que se incrementaban las concentraciones de manitol.

Otros autores como Espinosa *et al.* (2003) indicaron un fuerte efecto de la adición de manitol al 2% en el medio de cultivo MS sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de cuatro clones de boniato (*Ipomoea batata*), conservados *in vitro* durante 12 meses a 28 ± 2°C e iluminación solar.

Conclusiones y recomendaciones

Es posible conservar *in vitro* los recursos genéticos de malanga *Xanthosoma* durante más de 10 meses, en un medio de cultivo compuesto por sales y vitaminas MS suplementado con 4% de manitol y 4 mg.L⁻¹ de Nitrato de plata.

Se recomienda utilizar este medio de cultivo en el resto de las accesiones de malanga *Xanthosoma* y estudiar su comportamiento.

Referencias bibliográficas

- Engels J.M.M.; Wood, D. 1999. Conservation of agrobiodiversitu. In Wwood, D. and Lenné, J.M. (eds.) Agrobiodiversity: Characterization, Utilization and Management. CAB International, Wallingford, UK. pp:355-386.
- Espinosa A; González, O. y Silva, JJ. 2003. Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo. *Bioteología vegetal* 3(1): 37-41.
- García-Águila, L.; de Fera, M. y Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Bioteología Vegetal*. 7(2) 67 - 79.
- García, M.; Rodríguez, S.; Medero, V.; López, J.; Ventura, J.; Cabrera, M.; Rayas, A. y González, D.L. 1999. Investigación Participativa en Fitomejoramiento y Producción de Semilla de Aráceas (*Xanthosoma* y *Colocasia*) aplicando la Biotecnología. In: Simposio Internacional y Talleres sobre Fitomejoramiento Participativo en América Latina y el Caribe. <http://www.prgaprogram.org/cds/fmp/NADINE-PDF/García.pdf> (Consultada en octubre, 2011).
- Kameswara, R.N. 2004. Plant genetic resources advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. 3(2):136-145.
- Mafla, Graciela; Roa, J.C. y Debouck, D.G. 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. Disponible en: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/cartagenafinal1.pdf
- Matehus, J.; Romay, G. y Santana, Ma. A. 2006. Multiplicación *in vitro* de ocumo y taro. *Agronomía Tropical*. 56(4): 607-613.
- Montaldo, A.; Mantilla, J.; Zambrano, C. y Zárraga, P. 2004. Las aráceas comestibles: Ocumo y Taro. Luis Fuenmayor Toro, Editor. UCV. Ediciones OPSU. Primera Edición. Caracas, Venezuela. 250 pp.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15:473-496.
- Rayas, A, V Mederos; M García, J López; M Cabrera, J. Ventura; M. Martínez; V. Gutiérrez, M. Alvarez, M. Bauta (2002). Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. *Biotecnología Vegetal* 2(4): 249-251.
- Rayas, A; Cabrera, M.; Gutiérrez, V.; García, M.; López, J.; Rodríguez, S; Milián, M.; Medero, V.; Basail, M.; Santos, A.; Torres, Y.; Bauta, M; Toledo, H. 2008. Efecto del manitol sobre la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata*. XI Encuentro de Botánica "Johannes Bisse In Memoriam". 14 al 17 de noviembre/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.
- Salazar, S. 1991. Micropropagación de aráceas comestibles. In: Roca, W y L. Mroginski (eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 469-480.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. Castelló de la Plana. Publicaciones de la Universitat Jaume I, D.L. 258 p
- Uribe Trimiño, A. 2010. Conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de tres variedades de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch). Tesis presentada en opción del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán. México. 94 p.
- Whiters, L.A.; J.M.M. Engels. 1990. The test tube genebank – a safe alternative to field conservation. IBPGR News for Asia and de Pacific 3:1-2. In Engelmann, F. 1999. *In vitro* conservation of horticultural genetic resources review of the state art. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 495: 245-250.