Rev. Agricultura Tropical Vol. 2 No. 1:52-60, 2016
RNPS: 2397 (Versión electrónica)

EMPLEO DE LA BIOTECNOLOGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA CATEGORIZADA EN MALANGA

Víctor R. Medero Vega[1*], Milagros Basail Pérez[1], Oxiel Moreno Rumbaut[2], Arletys Santos Pino[1], Aymé Rayas Cabrera[1], Jorge López Torres[1], Yoel Beovides García[1], Sergio Rodríguez Morales[1], Nilo Maza Estrada[1], Wilfredo Caballero Álvarez[1], Yenisey Gutiérrez Sánchez[1], Dayana Rodríguez González[1], Carmen Pons Pérez[1], Daniel Rodríguez Pérez[1] y Mailyn Medero Ruiz[3]

1. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, CP: 53 000, Villa Clara, Cuba.
2. UEB Semillas Cienfuegos.
3. Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. Universidad de Cienfuegos.
** Autor para la correspondencia: vicedir.biotec@inivit.cu*

RESUMEN

En Cuba, los cultivares comerciales de malanga *Colocasia* y *Xanthosoma* presentan altos potenciales productivos, sin embargo, los rendimientos promedio nacionales relativamente son bajos. Sin embargo, es conocido que la calidad de la semilla constituye la base fundamental para recuperar los rendimientos por unidad de área y garantizar una agricultura sostenible. Por tal motivo, en el laboratorio de Biotecnología del INIVIT se desarrolló un trabajo que permitió establecer metodologías para la propagación masiva *in vitro* de este cultivo. Su implementación a nivel de Biofábricas y el empleo en las fincas de semillas provinciales y municipales, de plántulas producidas *in vitro* para consolidar el Esquema Nacional de Categorización de Semilla. Como resultado se logró la adopción de las metodologías de micropropagación en la Red Nacional de Biofábricas, la plantación de las plántulas en las fincas provinciales y la semilla producida se plantó en las fincas municipales. En fase de aclimatización y durante el trasplante a campo se lograron porcentajes de sobrevivencia superiores al 90% y al momento de la cosecha se obtuvo un índice de multiplicación que varió entre 1:15 a 1:22 semillas por planta producida *in vitro*. Con la aplicación práctica de esta estrategia se dispone de un material de plantación de alta calidad genética, fitosanitaria y rejuvenecido fisiológicamente que es utilizado como semilla categorizada (Básica) para garantizar el esquema de producción de semilla por provincia y a nivel nacional.

Palabras clave: Biofábricas, micropropagación, semilla categorizada.

USE OF BIOTECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF CATEGORIZED SEED IN MALANGA

ABSTRACT

In Cuba, commercial clones of taro *Colocasia* and *Xanthosoma* have high productive potential, however, the national average yields are remarkably low. Among other factors affecting this problem, the quality of the “seed” is the fundamental basis for recovering yields per unit area and ensures sustainable agriculture. Therefore, in the laboratory of Biotechnology INIVIT work that allowed us to establish methodologies for *in vitro* mass propagation of this culture it was developed. Its implementation Biofactories level and employment in the on-farm seed provincial and municipal plantlets produced *in vitro* to consolidate the National Seed Categorization Scheme. As a result, the adoption of

methodologies micropropagation in the National Biofactory Network, planting seedlings in the provincial on-farm and planted the seed produced in local farms was achieved. In acclimatization phase and during the transplantation field survival percentages above 90% were achieved and the time to harvest a multiplication rate which varied between 1:15 to 1:22 seeds per plant produced *in vitro* was obtained. With the practical application of this strategy are available planting material of high genetic quality, plant and rejuvenated physiologically that is used as seed categorized (basic) to ensure seed production scheme by province and nationally.
Keywords: Biofactories, micropropagation, seed categorized.

INTRODUCCIÓN

En Cuba, los cultivares comerciales de malanga de ambos géneros (*Colocasia esculenta* y *Xanthosoma* spp.) presentan altos potenciales productivos, sin embargo, los rendimientos promedios nacionales son bajos. En la última década, se ha incrementado de forma significativa los problemas fitosanitarios relacionados con la presencia de pudriciones secas de los cormos y cormelos. Esta situación se ha convertido en un factor negativo para la producción del cultivo y se estiman pérdidas en campos afectados que superan al 80% durante el almacenamiento (Espinosa, 2013; Folgueras y Herrera, 2006). Por tal razón, muchos productores están desmotivados para continuar incrementando sus plantaciones y por lo tanto peligra la presencia de este producto en el mercado.

La pudrición seca de la malanga es una enfermedad producida por un complejo de hongos fitopatógenos habitantes del suelo, la cual puede ser minimizada o controlada con el desarrollo de programas estratégicos para la producción de Semilla Categorizada a partir de plantas producidas *in vitro*, debido a la alta calidad genética y fitosanitaria que induce el cultivo de tejidos *per se.*

Por otra parte, en este cultivo, es muy difícil obtener semilla totalmente libre de enfermedades, particularmente de las del tipo viral como el Dasheen Mosaic Virus (DMV), que puede propagarse muy fácilmente a través de las partes vegetativas, lo cual puede ser solucionado con la aplicación de la biotecnología. (Hernández *et al*., 2000).

En las últimas décadas se ha avanzado en la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos; dentro de éstas, 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.

En el laboratorio de Biotecnología del INIVIT, se ha trabajado en este cultivo y se ha logrado establecer protocolos para la micropropagación por organogénesis (Medero *et al*., 1997; García *et al.,* 1999), donde se ha comprobado la superioridad del material de plantación de malanga producido por técnicas biotecnológicas en condiciones de campo.

Dentro de otros factores, la calidad de la semilla constituye la base fundamental para recuperar los rendimientos por unidad de área. El concepto semilla de alta calidad encierra una serie de parámetros que debe reunir el material de propagación que el productor debe conocer y manejar eficientemente como se establece en la carta tecnológica para aumentar la producción del cultivo.

Debido a lo anterior, el trabajo desarrollado tuvo como objetivos establecer metodologías para la propagación masiva *in vitro* de la malanga, su implementación a

nivel de Biofábricas y el empleo de las plántulas producidas *in vitro* como semilla Básica en las fincas de semilla para garantizar el Esquema Nacional de Certificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y en las áreas experimentales del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), en el período comprendido entre los años 2010 y 2016. Además, el escalado de las metodologías establecidas se realizó en la Red Nacional de Biofábricas y las plantas producidas *in vitro* se plantaron en la finca provincial de semilla de Cienfuegos para evaluar su respuesta en campo.

Procedimientos generales

Los medios y frascos de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121^{o}C de temperatura y 1,2 Kg.cm^{-2} de presión, el tiempo de esterilización se varió en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar, según información técnica de SIGMA (1991). El instrumental y las placas Petri (80x15 mm) para el manejo de los explantes fueron esterilizadas en estufa a 180^{o}C durante dos horas.

El pH de los medios de cultivo fue ajustado antes de la esterilización con NaOH (1,0 N) ó HCL (1,0 N). El manejo de los explantes se realizó en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar horizontal.

La fase de aclimatización de las plantas producidas *in vitro* se desarrolló según la metodología propuesta por Pérez *et al*. (1999) en un umbráculo cubierto por una malla plástica (Zarán), que logra una reducción de la intensidad luminosa del 70% durante esta etapa. El riego se realizó por microaspersión mediante sistema Microjet con una frecuencia de cuatro a seis riegos al día y una duración de dos minutos cada uno. Se garantizó una humedad relativa del 85-90%.

Para la aclimatización se utilizaron plantas producidas *in vitro* con una altura de 3,0 a 5,0 cm y de dos a cuatro hojas, las cuales fueron plantadas en bandejas de polieturano con 70 orificios o bolsas de polietileno con un sustrato formado por cachaza bien descompuesta o materia orgánica y a una profundidad de plantación de 1,0 cm.

Material vegetal

Con la finalidad de multiplicar y poner a punto las metodologías de micropropagación se utilizaron los nuevos cultivares comerciales obtenidos mediante el Programa de Mejoramiento Genético del instituto, tales como: INIVIT MC-2012, INIVIT MC-2005, México-8, INIVIT MX-2007 y Blanca INIVIT.

Medios de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se emplearon las sales “MS” propuestas por Murashige y Skoog (1962).

Condiciones del cultivo *in vitro*

Se utilizó luz artificial con un fotoperíodo de 16 horas de luz y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 62-68 µmol.m^{-2}.s^{-1} y temperaturas de 27$\pm$2°C.

Componentes del Sistema de Inmersión Temporal

Se emplearon baterías de cultivo formadas por frascos “Nalgene Co” de 10 litros de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio

de cultivo. Estos frascos fueron conectados entre sí por una manguera de silicona de 6 mm de diámetro mediante conectores que atraviesan la tapa. En la parte interna del frasco se colocó una manguera menos flexible y de igual diámetro, la cual desciende hasta el fondo en ambos recipientes. El medio de cultivo circuló de un frasco a otro en dependencia de la apertura o cierre de las electroválvulas, las cuales fueron conectadas a un temporizador programable para la determinación de la frecuencia y la duración de la inmersión. A la entrada de los frascos se colocaron filtros hidrofóbicos (0,22 µm, Midisart 2000, Sartorius AG) para garantizar la esterilidad y evitar pérdidas por contaminación. La presión de aire fue regulada por un manómetro y se utilizó un compresor de aire libre de aceite y con encendido automático (Escalona *et al.*, 1999).

Toma de explantes

Plantas madres fueron cultivadas en un Banco de Donante formado por túneles de cultivo cubiertos con malla antiáfidos y cámaras para la plantación y desarrollo de las plantas certificas como libres de virus que permiten disponer de un material de alta calidad genética y fitosanitario para la extracción e implantación *in vitro* de los cultivares de malanga que demanda cada provincia.

Ajuste del protocolo de micropropagación para los nuevos cultivares comerciales

Los subcultivos se realizaron a los 18 días, según Medero *et al*., 2015. Se estudió el efecto de diferentes hormonas (6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indolacético (AIA)) y concentraciones para la multiplicación *in vitro*. La desinfección de las yemas se realizó con hipoclorito de sodio según la metodología descrita por Medero *et al*., 1997. Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia en fase de aclimatización y en campo después del trasplante.

En el caso del empleo de los sistemas de inmersión temporal se utilizó la metodología descrita por Santos *et al.*, 2012; la cual establece el tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo por explante para el cultivo de la malanga.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ajuste del protocolo de micropropagación para los nuevos cultivares comerciales

Se logró establecer una metodología eficiente y repetitiva para la micropropagación de los cultivares comerciales de malanga de los géneros *Xanthosoma* y *Colocasia*. Se encontró que la mejor respuesta se alcanzó cuando las yemas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2,5% durante 10 min, lo cual coincide con los resultados descritos por Medero *et al*., 1997. Se demostró que al realizar los subcultivos cada 18 días se garantiza un coeficiente de multiplicación aceptable (1:2,3 ó 1:2,5) y la menor pérdida por contaminaciones para los cultivares estudiados de ambos géneros. Se determinó que la mejor respuesta se alcanzó cuando se suplementó al medio de cultivo con una combinación de hormonas formada por 3,0 $mg.L^{-1}$ de BAP y 1,0 $mg.L^{-1}$ de AIA.

Además, se desarrollaron otros experimentos para optimizar el protocolo de micropropagación del cultivar 'INIVIT MX-2007' (genero *Xanthosoma*), donde los resultados obtenidos mostraron incrementos en los coeficientes de multiplicación de 1:1,25 inicialmente a 1:2,70 (Basail *et al*., 2015).

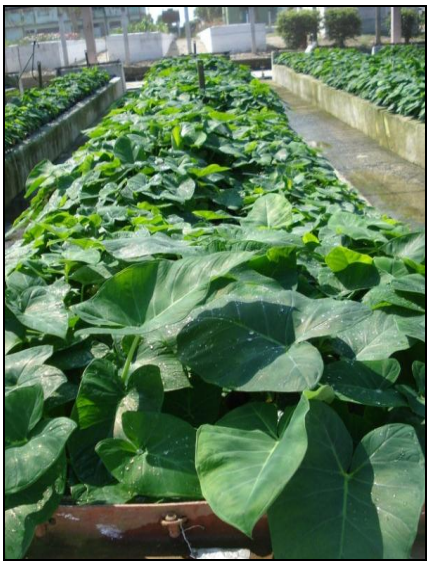
Por otra parte, la metodología de propagación por organogénesis, con énfasis en la etapa de establecimiento fue optimizada ya que con el empleo de los meristemos como

explante inicial durante el establecimiento *in vitro* del cultivar de malanga 'INIVIT MC-2012', se logró aumentar la eficiencia en esta etapa y disminuir las pérdidas por contaminantes endógenos (Santos *et al*., 2015).
En fase de aclimatización se lograron porcentajes de sobrevivencias superiores al 95%, plántulas con un desarrollo uniforme y buen vigor en su desarrollo. Además, se aplicó y demostró las grandes ventajas económicas del manejo de las plantas producidas *in vitro* durante la aclimatización para incrementar el número de plántulas obtenidas a partir del material propagado en el laboratorio y abaratar los costos por unidad.

Uso del Sistema de Inmersión Temporal para la producción de explantes
El uso y puesta a punto del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) garantizó un considerable incremento en los coeficientes de multiplicación de la malanga, de 1:2,7 hasta 15 ó 20 en dependencia del cultivar y el género.
Se determinó que con el empleo de un tiempo de inmersión de 10 minutos, una frecuencia cada tres horas (ocho inmersiones por día), 40 mL.explante^{-1} de medio de cultivo y un tiempo de cultivo de 21 días se alcanzó la mejor respuesta del material biológico, así como el mayor coeficiente de multiplicación. Por otra parte, no se observaron problemas de hiperhidricidad o muerte por hipoxia. En fase de aclimatización las plantas procedentes del SIT tuvieron una respuesta superior a las procedentes del medio de cultivo semisólido y sin presencia de cambios fenotípicos.

Introducción de las metodologías en la práctica socio – económica
En coordinación con la Empresa Nacional de Semillas y en el marco de un curso con todos los directores y especialistas de las Biofábricas, se les explicó de forma teórica y práctica los resultados obtenidos en el proceso tecnológico de la miropropagación de la malanga y, además, se les entregó de forma sistemática explantes certificados (diagnosticados y caracterizados morfoagronómicamente) de cultivares comerciales de los géneros *Colocasia* y *Xanthosoma* para su producción y adopción total de la metodología. También, durante los recorridos del Grupo Nacional de Viandas (GRUNAVI) se realizaron inspecciones técnicas y asesorías para la implementación correcta de la metodología, así como, previa coordinación con la dirección de la Biofábrica se le suministran explantes para dar cumplimiento a su plan de producción y cubrir las necesidades de la Delegación Provincial de la Agricultura de cada Provincia en cuanto a semilla Básica para el establecimiento de los programas de producción de semilla Certificada en este cultivo.

Producción y entrega de explantes certificados a las Biofábricas
En el laboratorio de biotecnología del INIVIT se produjeron los explantes certificados de malanga los cuales se distribuyeron a la Red Nacional de Biofábricas, y durante los últimos cinco años se han entregado de forma sistemática más de 80 000 explantes de malanga de los géneros *Colocasia esculenta* y *Xanthosoma* spp*,* lo cual ha permitió alcanzar producciones superiores a 1 300 000 plantas *in vitro* a nivel de Biofábrica (Figura 1).



Género *Xanthosoma*



Género *Colocasia*

Figura 1. Aclimatización de las plantas producidas *in vitro* de malanga en la Biofábrica de Villa Clara, listas para su comercialización.

Plantación de las plantas producidas *in vitro* en las fincas de semillas

Durante el trasplante a campo se lograron porcentajes de sobrevivencia superiores al 90% y al momento de la cosecha se obtuvo un índice de multiplicación que varió entre 1:15 y 1:22 cormelos semilla por planta producida *in vitro*, independientemente del cultivar propagado y la especie (Figura 2, 3 y 4).



Figura 2. Respuesta en campo de las plantas producidas *in vitro* del cultivar INIVIT MC-2012, en la Finca Provincial de Semillas de Cienfuegos.



Figura 3. Respuesta en campo de las plantas producidas *in vitro* del cultivar México-8, Finca de semilla Güira de Melena, Artemisa.



Figura 4. Respuesta en campo de las plantas producidas *in vitro* del cultivar INIVIT MX-2007, en la Finca Provincial de Semillas de Cienfuegos.

Posteriormente, el material de plantación producido en las Fincas Provinciales de Semillas se plantó en las fincas municipales y de ahí se utilizó como semilla categorizada en las Empresas Agropecuarias de cada provincia.
En general, la aplicación práctica de esta estrategia permitió la obtención de un material de plantación de alta calidad genética, fitosanitaria y rejuvenecido fisiológicamente que incrementa los rendimientos entre el 15 y el 20%. Además, la planta producida *in vitro* tiene que ser utilizada como semilla categorizada (tipo básica) para consolidar el Esquema de Producción de Semilla por provincia y a nivel nacional. Estos resultados fueron alcanzados en las provincias de Cienfuegos, Pinar del Río y Villa Clara. Finalmente, la adopción de la metodología de micropropagación de la malanga por las diferentes Biofábricas garantiza la introducción rápida de nuevos genotipos mejorados e incrementa la composición clonal del cultivo y su producción.

CONCLUSIONES

Se logró la adopción de la metodología de micropropagación de la malanga en la Red Nacional de Biofábricas y se demostró que con la utilización de las plántulas producidas *in vitro* como semilla Básica en las Fincas Provinciales de Semilla y su comercialización

en las fincas municipales, productores líderes y empresas agropecuarias, se consolidará la recuperación de este cultivo y se garantizará la presencia de este importante producto en el mercado nacional.

BIBLIOGRAFÍA

BASAIL M.; V.R. MEDERO, Y. TORRES, A. ROBAINA, J. LÓPEZ, A. SANTOS, A. RAYAS y Y. BEOVIDES. 2015. Influencia de la concentración de reguladores de crecimiento para la multiplicación del clon de malanga 'INIVIT MX-2007'. *Agricultura Tropical*, 1(1): 33-38.

ESCALONA, M.; J.C. LORENZO; B. GONZÁLEZ; M. DAQUINTA; C. BORROTO; J.L. GONZÁLEZ; Y. DESJARDINS. 1999. Pineapple micropropagation in temporary immersion system. *Plant Cell Reports,* 18(9): 743-748.

ESPINOSA, E. 2013. Manejo agrotécnico del cultivo de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott y *Colocasia esculenta* Schott) para el combate de las pudriciones secas. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 100 p.

GARCÍA, M.; V. MEDERO; S. RODRÍGUEZ; J. LÓPEZ y col. 1999. Generalización de la metodología para la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. En: Memorias del *5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal*. pp. 167-169.

HERNÁNDEZ, R.; D. BERMÚDEZ; J. E. GONZÁLEZ; J.M. MACHADO; A. PAIROL y M. GARCÍA. 2000. Establecimiento de un sistema de diagnóstico por UM-ELISA para DMV en Aráceas. Certificación de vitroplantas de géneros comerciales para la introducción en biofábricas. *Centro Agrícola,* 27(1):12-18.

MEDERO, V.; M. BASAIL, O. MORENO, A. SANTOS, A. RAYAS, J. LÓPEZ, Y. BEOVIDES, S. RODRÍGUEZ, J.L. RAMOS, W. CABALLERO, Y. GUTIÉRREZ, D. RODRÍGUEZ, C. PONS y D. RODRÍGUEZ. 2015. Impacto de la Biotecnología en la producción de semilla de raíces y tubérculos tropicales. CD Memorias del III Simposio Internacional de raíces, rizomas, tubérculos, plátanos, bananos y papaya. 20 al 23 de octubre de 2015. ISBN: 978-959-295-011-5. file:/// Biotecnologia%20Vegetal/Reportes/BV-C.01.pdf

MEDERO, V.; M. GARCÍA; O. CABRERA; J. LÓPEZ y J.C. VENTURA. 1997. Generalización de la tecnología de micropropagación de la malanga a escala comercial. *Agrotecnia de Cuba*, 27 (2-3), 125-130.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum,* pp. 473-497.

PÉREZ PONCE, J.N.; M. SUÁREZ CASTELLÁ y P. ORELLANA PÉREZ. 2000. Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Reseña Biotecnología Vegetal,* (1):3-12.

PEREZ, J.; E. JIMENEZ y D. AGRAMONTE. 1999. Posibilidades y potencial de la micropropagación masiva de plantas en Cuba. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba, pp. 200-212.

SANTOS, A; M. CABRERA, R. GÓMEZ, J. LÓPEZ, D. GÁLVEZ, D. REINALDO, A. RAYAS, M. BASAIL, V. MEDERO y Y. BEOVIDES. 2012. Multiplicación *in vitro*

del clon de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma* spp.) en sistemas de cultivo semiautomatizado. *Biotecnología Vegetal*, 12 (2):113-118.

SANTOS, A.; D. REINALDO; J. LÓPEZ; M. BASAIL; V. MEDERO; Y. GUTIÉRREZ; A. RAYAS; Y. BEOVIDES y M. BAUTA. 2015. Incremento de la eficiencia en el establecimiento *in vitro* de la malanga 'INIVIT MC-2012' (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.). *Agricultura Tropical*, 1(1): 70-74.

SIGMA. 1991. Catalogue. Sigma Chemical Company. EUA.