Evaluación de medio líquido y semisólido en la micropropagación de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schoot)

Marving Bayardo Navarro Paniagua

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación de medio líquido y semisólido en la micropropagación de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schoot)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Marving Bayardo Navarro Paniagua

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2013

Evaluación de medio líquido y semisólido en la micropropagación de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schoot)

Marving Bayardo Navarro Paniagua

Resumen: La malanga es una planta herbácea anual la cual produce un cormo central comestible. Es nutricional esencialmente en energía por su alto contenido de carbohidratos. Entre los cultivos farináceos como la yuca y la papa, la malanga es la que mayor contenido de proteína tiene. Es una planta con gran potencial para las zonas tropicales, su importancia radica en la dieta humana, animal y diferentes usos industriales. La forma de propagación convencional de la malanga facilita la diseminación de plagas y enfermedades. Estas son diseminadas en las nuevas áreas de producción a través del material de siembra. Se han realizado estudios en los cuales señalan que plantas producidas *in vitro*, obtuvieron cambios en el patrón de crecimiento, velocidad de crecimiento y tolerancia a enfermedades. Razones por la cual la multiplicación *in vitro* es una herramienta de gran ayuda para la propagación de este tubérculo, generando una producción masiva, rápida y libre de patógenos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del medio líquido y semisólido suplementado con BAP y Kinetina en la formación de brotes durante establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga. Se encontró diferencias significativas entre los cuatro tratamientos siendo superior el semisólido suplementado con BAP, teniendo el mayor número de brotes por explante y número de microesquejes totales.

Palabras clave: BAP, explante, Kinetina, microesqueje, micropopagación.

Abstract: Taro is a herbaceous plant which produces a edible corm. It is nutritional essentially in energy due to its high content of carbohydrates. Between farinaceous crops such as cassava and potatoes, taro has the highest protein content. It is a plant with great potential for the tropics, its importance lies in the human diet, animal and industrial uses. The conventional way of propagation of taro facilitates the spread of pests and diseases. These are spread in new production areas through the planting material. There have been studies which indicate that plants grown *in vitro*, had changes in the pattern of growth, growth rate and disease tolerance. Reason why the *in vitro* multiplication is a useful tool for the propagation of this plant, generating a mass production, fast and free of pathogens. The objective of this study was to evaluate the effect of liquid and semi-solid medium supplemented with BAP and Kinetin on buds formation during establishment and multiplication *in vitro* of taro. Significant difference was found between the four treatments being higher the semisolid medium supplemented with BAP. This treatment present the highest number of shoots per explant and number of living microcuttings.

Key words: BAP, explant, Kinetin, microesqueje, micropropagation.

CONTENIDO

Portadilla i
Página de firmas ii
Resumen iii
Contenido iv
Índice de cuadros, figuras y anexos v

1. INTRODUCCIÓN 1

2. MATERIALES Y MÉTODOS 2

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 7

4. CONCLUSIÓN 9

5. RECOMENDACIONES 10

6. LITERATURA CITADA 11

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1. Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la etapa de establecimiento *in vitro* de malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). 4
2. Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la etapa de multiplicación *in vitro* de Malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). 6
3. Porcentaje de sobrevivencia y explantes que formaron brotes en el establecimiento de malanga en medios MS modificado y suplementado con BAP y Kinetina. 7
4. Efecto de Kinetina y BAP en medio líquido y semisólido en la formación de brotes durante el establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga. 8
5. Producción de brotes totales de malanga en las fases de establecimiento y multiplicación utilizando meristemas apicales en cuatro diferentes tratamientos..... 8

Figuras Página

1. Extracción de meristemas apicales de malanga..... 2
2. Desinfección, enjuague y establecimiento de meristemas apicales de malanga.. 3
3. Multiplicación y extracción de brotes de malanga.. 5

1. INTRODUCCIÓN

La malanga **(***Colocasia esculenta* L. Schoot**)** de la familia de las Araceae, es una planta herbácea la cual se propaga por medio de secciones del cormo central con un peso aproximado de 100-150 g con 3 a 4 yemas. Las secciones de cormo se colocan de 6-7 cm de profundidad en suelos franco limosos o arenosos, con un pH de 5.5 a 6.5 a una altitud que va de 0 a 1000 msnm. Para una producción óptima la temperatura debe oscilar entre 25 a 35 °C. Su ciclo consta de nueve meses, siendo un cultivo con gran demanda de agua (Martínez Alvarado *et al*. 2010).

La malanga tiene su origen en el sureste de Asia, entre India e Indonesia. Es un tubérculo el cual produce un cormo central comestible. Es nutricional esencialmente en energía por su alto contenido de carbohidratos. Entre los cultivos farináceos como la yuca y la papa, la malanga es la que mayor contenido de proteína tiene (Enríquez Juárez y Mairena Úbeda 2011).

La malanga es una planta con gran potencial para las zonas tropicales, su importancia radica en la dieta humana, animal y diferentes usos industriales. En América Central los únicos países que actualmente la exportan son Nicaragua y Costa Rica (Martínez Alvarado *et al*. 2010). Pero el área de producción de estos se ha reducido debido a que los productores no se ven atraídos a este cultivo por el envejecimiento fisiológico que se ha producido en las semillas a través de los años (García *et al.* s.f).

La forma de propagación convencional de la malanga facilita la diseminación de plagas y enfermedades. Estas son diseminadas en las nuevas áreas de producción a través del material de siembra. Uno de los mayores problemas es la presencia del virus del mosaico de dasheen (Enríquez Juárez y Mairena Úbeda 2011). Se han realizado estudios en los cuales señalan que plantas producidas *in vitro*, obtuvieron cambios en el patrón de crecimiento, velocidad de crecimiento y tolerancia a enfermedades (Monge *et al.* 1987). Por esta razones la multiplicación *in vitro* es una herramienta de gran ayuda para la propagación de este cultivo, generando una producción masiva, rápida y libre de patógenos (Enríquez Juárez y Mairena Úbeda 2011).

El objetivo de este estudio fue:

- Evaluar el efecto de medios líquidos y semisólidos suplementados con BAP (6-benciloaminopurina) y Kinetina en la formación de brotes durante establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schoot)**.**

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Ubicada en el Valle del Yeguare a 30 km de Tegucigalpa, Honduras durante los meses de Abril a Octubre del 2013.

Preparación del Material Vegetal. Para la obtención de los meristemas apicales se utilizaron cormos procedentes de la aldea Santa Rosa municipio de San Antonio de Oriente. A los cormos se les eliminó todo material vegetal hasta dejarlo de 3 cm de largo (Figura 1).

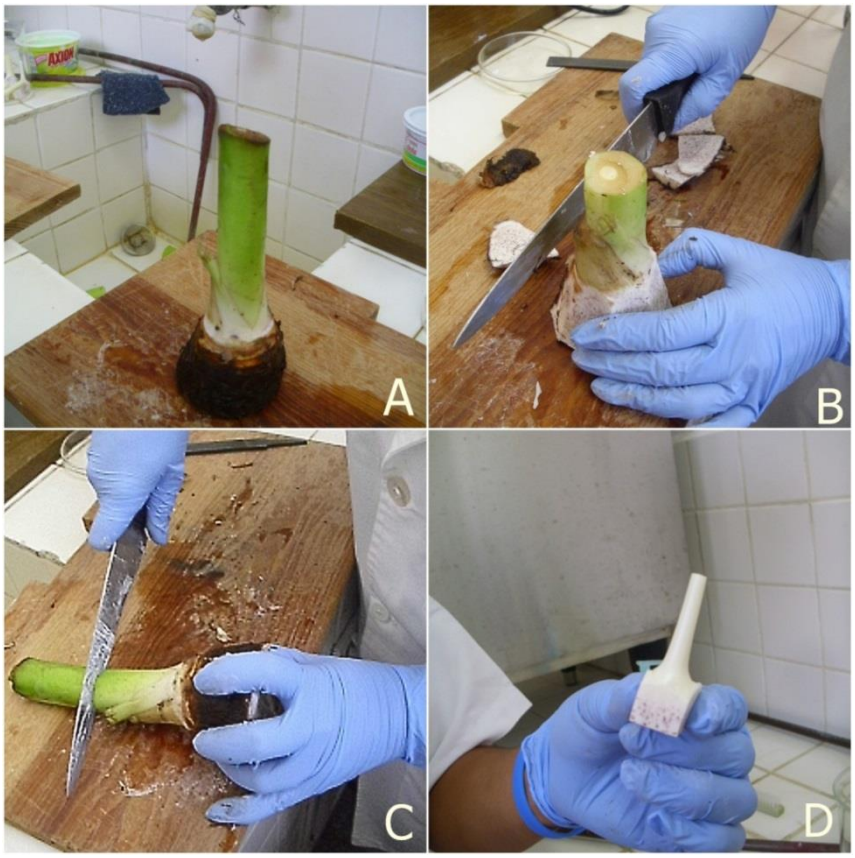

Figura 1. Extracción de meristemas apicales de malanga. A- Cormo de malanga, B- remoción de base, C- corte de tallo hasta encontrar los meristemas apicales, D-cormo reducido listo para desinfección.

Desinfección del Explante. Los cormos reducidos fueron sometidos al proceso de desinfección superficial, se lavaron tres veces con agua corriente y jabón líquido comercial,
se sumergieron en alcohol al 70% por un minuto, después se sumergieron por 30 minutos en una solución de NaClO al 30% (v/v) (cloro comercial al 4.72% de ingrediente activo) a esta solución se le aplicaron dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml de la solución (Figura 2).

Establecimiento del Cultivo. El establecimiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, está fue encendida 30 minutos antes de la siembra y desinfectada con alcohol al 70%, las herramientas fueron esterilizadas con calor seco a 250°C por 20 segundos. Los meristemas apicales se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, para luego proceder a la reducción de las capas externas hasta dejarlo a una altura de aproximadamente un centímetro (Figura 2).

Una vez reducidos los meristemas apicales se colocaron en frascos con medios de cultivo esterilizado. Se codificaron los frascos para su identificación y se encubaron en el cuarto de crecimiento 21 días a una temperatura de 22°C, 60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

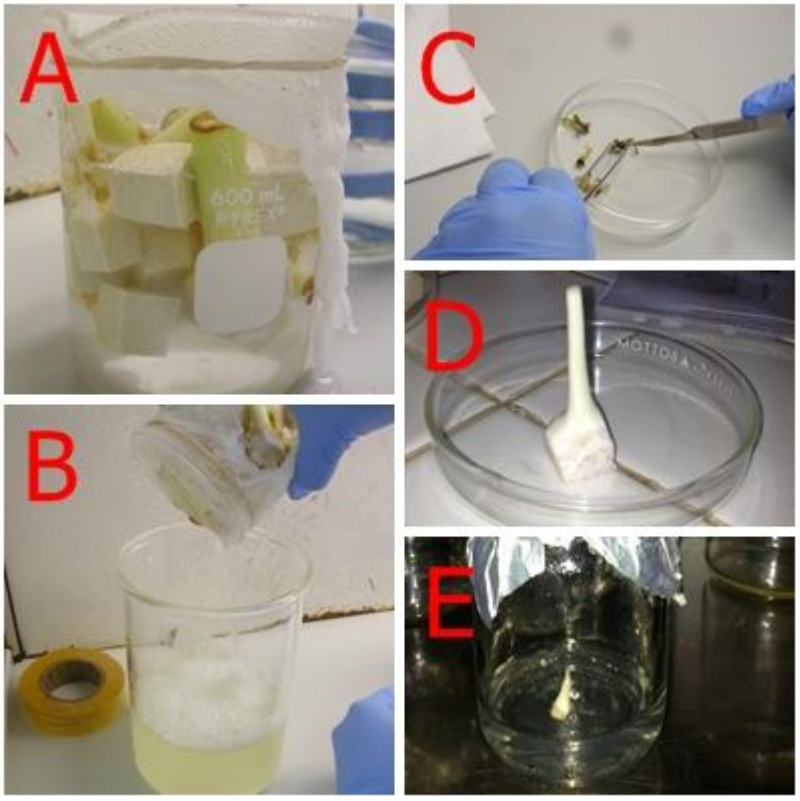

Figura 2. Desinfección, enjuague y establecimiento de meristemas apicales de malanga. A- meristemas en solución desinfectante, B- enjuague de meristemas apicales con agua

destilada estéril, C- reducción de meristemas apicales a 1 cm, D- meristema de 1 cm de altura, E- meristema establecido en el medio de cultivo.

Preparación del medio de cultivo. Se evaluaron cuatro medios de cultivo de los cuales dos fueron líquidos y dos semisólidos basados en el de Murashige y Skoog (MS) (1962) (Cuadro 1), suplementado con:

- Tratamiento A 2.87 mg/L de BAP(6-bencilaminopurina) (medio sólido)
- Tratamiento B 2.87 mg/L de BAP(6-bencilaminopurina) (medio líquido)
- Tratamiento C 2.00 mg/L de Kinetina (medio sólido)
- Tratamiento D 2.00 mg/L de Kinetina (medio líquido)

En la preparación de los cuatro medios de cultivo se utilizó agua destilada, se ajustó el pH a 5.7 utilizando KOH y/o HCL, se dispensaron 20 ml de medio semisólido y 3 ml de medio líquido en cada frasco luego fueron sellados con papel aluminio, se introdujeron en la autoclave a 15 PSI, 120°C por 20 minutos para la esterilización. Los medios semisólidos fueron gelificados usando 1.8 g/L de Phytagel®.

Cuadro 1. Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la etapa de establecimiento *in vitro* de malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott).

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macro elementos	$CaCl_2.2H_2O$	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	1900.000
	$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratada	370.000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1650.000
Micro elementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$CoCl_2.6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	$MnSO_4.4H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes Orgánicos			
		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	0.400
		ANA	0.200
		Sacarosa	30000.000

Fuente: CIAT 1991

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA), ya que el experimento se llevó a cabo en un laboratorio donde las condiciones ambientales fueron controladas y homogéneas.

Datos a evaluar. Se cuantificó el número de brotes totales generados y el porcentaje de explantes sobrevivientes para cada tratamiento al finalizar la etapa de establecimiento.

Fase de Multiplicación. Para la etapa de multiplicación se utilizó el material establecido y durante esta segunda etapa se realizó la separación de los brotes producidos cada 21 días, hasta llegar al subcultivo cuatro.

En la etapa de multiplación se evaluaron cuatro medios de cultivos dos líquidos y dos semisólidos basados en el de Murashige y Skoog (MS) (1962) (Cuadro 2). Los medios semisólidos fueron gelificados usando 1.8 g/L de Phytagel ®, y suplementados con:

- Tratamiento A 4.3 mg/L de BAP(6-bencilaminopurina) (medio sólido)
- Tratamiento B 4.3 mg/L de BAP(6-bencilaminopurina) (medio líquido)
- Tratamiento C 3.0 mg/L de Kinetina (medio sólido)
- Tratamiento D 3.0 mg/L de Kinetina (medio líquido)

A los meristemas apicales establecidos se les removió el material vegetal necrótico y las hojas. Además se separaron los brotes generados por el explante, estos fueron identificados, y se colocaron individualmente en un frasco con el nuevo medio. Se eliminaron los cultivos contaminados (Figura 3).

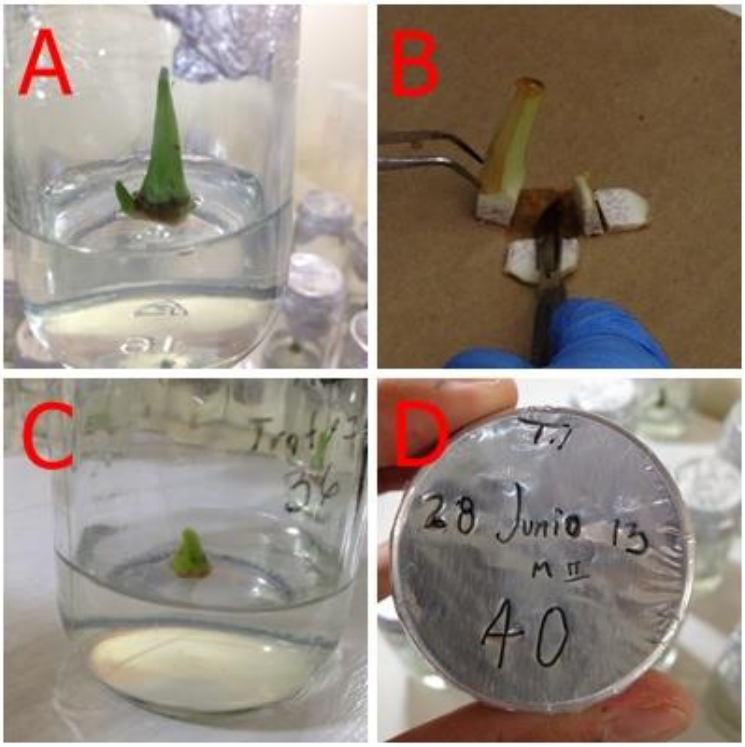

Figura 3. Multiplicación y extracción de brotes de malanga. A- microesquejes con un brote, B-limpieza y separación de brotes, C- explante en el nuevo medio, D- identificación del explante.

Cuadro 2. Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la etapa de multiplicación *in vitro* de Malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott).

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macro elementos	$CaCl_2.2H_2O$	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	1900.000
	$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratada	370.000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1650.000
Micro elementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$CoCl_2.6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	$MnSO_4.4H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes Orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	0.100
		Piridoxina	0.500
		Acido Nicotínico	0.500
		Glicina	2.000
		Sacarosa	30000.000

Fuente: CIAT 1991

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA).

Datos a evaluar. Se cuantificó el número de brotes totales generados por cada tratamiento al finalizar cada una de las cuatro fases de multiplicación o subcultivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la fase de establecimiento se observó que en los medios líquidos la sobrevivencia fue de aproximadamente 50%, mientras que en los semisólidos, fue de más del 90% también se observó que el medio semisólido suplementado con 2.87 mg/L de BAP obtuvo el mejor porcentaje de explantes que formaron brotes (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de sobrevivencia y explantes que formaron brotes en el establecimiento de malanga en medios MS modificado y suplementado con BAP y Kinetina.

Tratamientos		Establecimiento		
		Número de explantes	Sobrevivencia (%)	Explantes que formaron brotes (%)
Sólido	BAP	40	93	20.00
Líquido	BAP	32	56	3.12
Sólido	Kinetina	45	100	2.22
Líquido	Kinetina	45	53	0.00

En el medio semisólido suplementado con 4.3 mg/L de BAP tuvo el mayor promedio de brotes por explante 11.46 al final del subcultivo, por lo cual se consideró que es el medio más apropiado para la multiplicación de malanga **(***Colocasia esculenta* L. Schoot**)** (Cuadro 4)**.** Lo cual va acorde con Vilchez *et al.* (2009) quien argumenta que la inducción de nuevos brotes está directamente relacionada con la incorporación de BAP en el medio.

El estudio de Vilchez *et al*. (2009) utilizando BAP obtuvo el mismo número de brotes que Monge *et al.* (1987) utilizando Kinetina. A diferencia de este estudio el cual muestra que sí hay diferencia significativa en estas dos citoquininas.

Durante los cuatro subcultivos realizados en la etapa de multiplicación se observó el más alto número de brotes producidos por explante en el tratamiento semisólido BAP al finalizar el subcultivo 4 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de Kinetina y BAP en medio líquido y semisólido en la formación de brotes durante el establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga.

Tratamientos		Promedio de brotes por explante				
		Establecimiento	Multiplicación			
			1	2	3	4
Sólido	BAP	1.22 a	1.85 a	4.74 a	7.11 a	11.46 a
Líquido	BAP	1.05 b*	1.08 b	1.14 b	3.50 b	5.00 b
Sólido	Kinetina	1.03 c	1.21 b	2.03 b	3.53 bc	4.25 bc
Líquido	Kinetina	1.00 b	1.00 b	1.00 b	1.22 c	1.38 c

*Letras iguales no representan diferencias significativas según la prueba de Duncan (P 0.05).

Otro factor importante que se observó es que a medida que aumenta el número de subcultivos hay una tendencia al incremento del número de brotes generados por explante en todos los medios. Siendo superior el protocolo propuesto en las dos fases (establecimiento y multiplicación) el cual tuvo un mayor aumentando en la productividad del material propagado comparado a los otros tres tratamientos (Cuadro5).

Cuadro 5. Producción de brotes totales de malanga en las fases de establecimiento y multiplicación utilizando meristemas apicales en cuatro diferentes tratamientos.

Tratamientos		No. de microesquejes al finalizar					
		No. de explantes establecidos	Establecimiento	Multiplicación			
				1	2	3	4
Sólido	BAP	40	45	63	161	242	378
Líquido	BAP	32	19	13	8	7	10
Sólido	Kinetina	45	46	45	75	127	153
Líquido	Kinetina	45	19	16	10	11	12

4. CONCLUSIÓN

- El medio más apropiado para la micropropagación de malanga es el medio basal de Murashige y Skoog (1962) semisólido modificado y suplementado con 2.87 mg/L de BAP para establecimiento y 4.3 mg/L de BAP para multiplicación.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio con el medio líquido suplementado con BAP pero con agitación permanente o inmersión temporal.

- Probar el medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) semisólido suplementado con BAP con otro tipo de explante y variedades de malanga.

- Continuar con el experimento para la determinación del medio adecuado en la etapa de enraizamiento.

- Implementar un protocolo para aclimatación de plántulas en invernadero y su respectiva evaluación en campo.

6. LITERATURA CITADA

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W., Mroginski, L (eds), Cali, Colombia. p 469-481.

Enríquez Juárez, D. y E. Mairena Úbeda. 2011. Efecto de dos condiciones de humedad del suelo y tiempo de cosecha sobre el rendimiento de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) para exportación. Tesis Ing. Agr. Boaco, Nicaragua. UNA. 2p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT).s.f. La agricultura amazónica y caribeña (En línea) consultado el 28 de junio de 2013. Disponible en: http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap4_8.htm#auto

García, M., S. Rodríguez., J. Medero., J. Lopez., J. Ventura., M. Cabrera y A. Rayas. s.f. Investigación Participativa en Fitomejoramiento y Producción de Semilla de Aráceas (*Xanthsoma* y *Colocasia)* Aplicando la Biotecnología. INIVIT. Santo Domingo, Cuba. P 1-2.

Martínez Alvarado, C., M. Muñozcano Ruiz y J. Santoyo Juárez. 2010. Paquete tecnológico para el establecimiento de malanga. Resultados de Proyectos. 7-11 p.

Monge, M., L. Gomez, R. Valverde y O. Arias. 1987. Evaluación preliminar del comportamiento en el campo de plantas Ñanpi (*Colocasia esculenta* var. Antiguorum) provenientes del cultivo *in vito* de ápices. Agronomía Costarricense. 11(2): 189-191p.

Vilchez, J., Y. Rivas., N. Albany, M. Molina, y L. Martinez. 2009 Effect of the B6-benzylaminopurine on *in vitro* multiplication of Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). Proyecto autofinanciado. Consejo de Desarrollo Científico y Humanitario. 212-222p.