

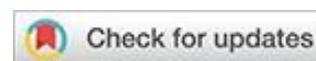
Conservación *in vitro* de *Colocasia esculenta* (Araceae) bajo condiciones de crecimiento mínimo

In vitro Conservation of *Colocasia esculenta* (Araceae) Under Minimal Growth Conditions

Aymé Rayas Cabrera *¹, Arletys Santos Pino¹, Milagros Basail Pérez¹, Jorge López Torres¹, Víctor R. Medero Vega¹, Yoel Beovides García¹

¹<http://www.inivit.cu> / Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) / Santo Domingo, Villa Clara / Cuba.

*Corresponding author. conserv.biotec@inivit.cu



RESUMEN

Los recursos fitogenéticos constituyen la base de la seguridad alimentaria de la humanidad. Por ello, preservar la identidad genética de cada variedad resulta esencial para su uso local o global. La conservación *ex situ*, mediante técnicas de cultivo de tejidos, garantiza el mantenimiento del patrimonio genético de cada accesión introducida al banco de germoplasma *in vitro*.

Este estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) con el objetivo de determinar el medio de cultivo más adecuado para la conservación *in vitro* del germoplasma de malanga (*Colocasia esculenta*) mediante cultivo en condiciones de crecimiento mínimo. Se evaluaron diez medios de cultivo con diferentes concentraciones de manitol (10, 20, 30 y 40 g L⁻¹), con y sin nitrato de plata.

A los ocho meses de cultivo se analizaron el número de hojas activas, el número de brotes, el porcentaje de supervivencia y la capacidad de regeneración de los explantes tras la conservación y durante la aclimatización. El medio de cultivo con 20 g L⁻¹ de manitol, sin nitrato de plata, propició la obtención de plantas con las características idóneas para la conservación *in vitro*: hojas pequeñas, múltiples brotes y menor crecimiento. Además, este medio favoreció el mayor porcentaje de regeneración y supervivencia durante la aclimatización. Las plantas regeneradas mantuvieron las características morfológicas del cultivar estudiado.

Palabras clave: malanga, osmorreguladores, recursos genéticos, conservación *in vitro*, germoplasma

ABSTRACT

Phytogenetic resources are the foundation of global food security. Preserving the genetic identity of each variety is crucial for their local or global use. *Ex situ* conservation through tissue culture techniques ensures the preservation of the genetic heritage of each accession introduced into the *in vitro* germplasm bank.

This study was conducted at the Research Institute of Tropical Roots and Tuber Crops (INIVIT) to determine the most suitable culture medium for *in vitro* conservation of taro (*Colocasia esculenta*) germplasm under minimal growth conditions. Ten culture media with different mannitol concentrations (10, 20, 30, and 40 g L⁻¹), with and without silver nitrate, were tested.

After eight months of culture, active leaf number, shoot number, survival rate, and explant recovery during conservation and acclimatization were evaluated. The culture medium containing 20 g L⁻¹ of mannitol without silver nitrate resulted in plants with desirable traits for *in vitro* conservation: small leaves, multiple shoots, and reduced growth. Additionally, this medium promoted the highest plant regeneration rate and survival during acclimatization. The regenerated plants retained the morphological characteristics of the studied cultivar.

Keywords: taro, osmoregulators, genetic resources, *in vitro* conservation, germplasm

INTRODUCCIÓN

En el mundo se cultivan numerosas raíces y tubérculos, la malanga, *Colocasia esculenta* (L) Schott, es una de las que se utilizan con diversos fines. Es una herbácea erecta ampliamente diseminada en la región tropical y subtropical perteneciente a la familia Araceae 1,2. Procede del sudeste asiático³. Se cosecha a gran escala en África, aunque se desconoce el momento de su propagación a la región y hoy en día ha adquirido gran importancia⁴.

Sus tubérculos son fuentes importantes de carbohidratos y se usan como alimento básico en países tropicales y subtropicales. Se produce principalmente por el alto contenido de nutrientes de sus cormos subterráneos que contienen de 70 a 80 % de almidón, y por su uso tanto en medicina como en el desarrollo de biocombustibles, en áreas de alta precipitación en condiciones de inundación, generalmente por pequeños agricultores^{5,6,7}.

Además, en esta especie, se ha documentado la presencia de metabolitos secundarios con actividad antitumoral, antimetastásica, antioxidante y antiinflamatoria^{5,8,9}. Debido a los beneficios de los fitoesteroles presentes en el rizoma que inhiben la absorción del colesterol malo (LDL) en el organismo ayuda a prevenir diversas enfermedades asociadas al colesterol alto¹⁰.

La malanga, también forma parte de la familia de tubérculos que por sus altos contenidos de almidón y fibra dietética¹¹ ha sido utilizada tanto en la alimentación humana como animal especialmente en cerdos^{12, 13, 14, 15}.

Su producción alcanzó los 12,1 millones de toneladas en 2017 y ocupó el quinto lugar entre los tubérculos, detrás de la papa, la yuca, el boniato y el ñame¹⁶ (FAO 2019). Estos recursos se consideran la base de la seguridad alimentaria, por lo que se deben implementar estrategias dirigidas a su conservación y propagación¹⁷ (FAO 2018). Una estrategia para la conservación del germoplasma vegetal incluye técnicas de cultivo de tejidos vegetales mediante el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro*^{18,19}. Los sistemas *in vitro* para la conservación a medio plazo ofrecen la ventaja de ahorrar recursos como materiales, espacio y mano de obra, además de preservar el material vegetal durante un período de tiempo indeterminado a través del subcultivo^{20,21}.

El germoplasma de este género tradicionalmente se conserva en colecciones de campo. El efecto de plagas y enfermedades puede ser desastroso y reducir el número de accesiones en la colección que representa la diversidad genética. Del mismo modo, problemas climáticos también pueden tener un impacto negativo en las mismas. Establecer la estrategia de conservación para una especie en particular requiere el desarrollo de un sistema de regeneración *in vitro*^{20,22}.

Un programa de conservación de recursos genéticos requiere la combinación de varios métodos de conservación, por lo que la conservación *in vitro* complementa este objetivo. Para esto se requiere el desarrollo de estrategias de regeneración como la micropropagación^{20,22}. Esto reafirma la importancia de crear bancos de

genes *in vitro* y conservar todas las entradas necesarias para representar la mayor variabilidad genética posible. Para esto es necesario evaluar el crecimiento lento, estas metodologías se han evaluado para el género *Xanthosoma*²³ pero en *Colocasia* no se han encontrado resultados favorables al respecto.

La conservación *in vitro* de germoplasma se centra en controlar el crecimiento normal de explantes viables – reduciéndolo o deteniéndolo – manipulando ya sea la constitución del medio de cultivo y/o las condiciones de almacenamiento. Esta herramienta que se desarrolló desde inicios del siglo XX es hoy una posibilidad de recuperar plantas completas, que estén en peligro de extinción, así como preservar el acervo de algunas especies importantes para generaciones futuras²⁴.

El género *Colocasia* ha sido bien estudiado en cultivo de tejidos, se han desarrollado sistemas de propagación óptimos para una amplia gama de variedades^{25,26,27,28,29,30,31}. Además, parece ser también un cultivo relativamente estable, tanto en el campo como en cultivo de tejidos, por lo que es adecuado para el almacenamiento *in vitro*.

Todo lo anterior nos insta a identificar las condiciones de conservación apropiadas para esta colección, por lo que se desarrolla esta investigación con el objetivo de determinar el medio de cultivo para la conservación *in vitro* del germoplasma de malanga (*Colocasia esculenta*) a través de cultivo en condiciones de crecimiento mínimo.

MATERIALES AND METODOS

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba. En el período comprendido entre diciembre del 2018 y enero del 2020.

Procedimientos generales

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C de temperatura y una presión de 1,2 Kg.cm⁻²; el tiempo de esterilización varió en dependencia del volumen de medio de cultivo. El instrumental (pinzas, espátulas y bisturí) se desinfectó en un esterilizador eléctrico (DENT-EQ) que permaneció dentro del flujo laminar horizontal. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura 27 ± 2°C y régimen de 16 horas de luz (DFFF de 62-68 μmol m⁻²s⁻¹) y ocho de oscuridad.

El manejo de los materiales biológicos (implantaciones, subcultivos y cambios de medios de cultivo), se realizó en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar horizontal. En la totalidad de los experimentos se aplicó un diseño completamente aleatorizado por entender homogéneas las condiciones de cultivo dentro de las cámaras y considerar como única fuente de variación los tratamientos.

Material vegetal

Como material vegetal se utilizó el cultivar de malanga ‘INIVIT MC-2012’, procedente del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Cultivar de alto potencial de rendimiento, obtenido por selección clonal, apoyado en fitomejoramiento participativo de productores y con un ciclo de cosecha que oscila entre 9 y 12 meses³², es el más cultivado en el país en estos momentos.

Como explante se utilizaron meristemos de 0,6 mm, para su extracción se empleó el protocolo descrito por Santos²⁶, para este cultivo. El establecimiento se realizó en el medio de cultivo líquido constituido por el 80% de las sales y vitaminas³³ (MS), con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, complementado con 0,5 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0,05 mg L⁻¹ de AIA^{29,31}. El material procedente de la fase de establecimiento se multiplicó durante cinco subcultivos según un protocolo descrito para la especie²⁸, hasta obtener suficiente material vegetal para desarrollar los experimentos.

Los explantes fueron incubados a 27 ± 2°C y régimen de 16 horas de luz (DFFF de 62-68 μmol m⁻²s⁻¹) y ocho de oscuridad.

Con el objetivo de determinar cuánto se puede disminuir la concentración de las sales en el cultivo de la malanga *Colocasia* se estudiaron cuatro tratamientos con concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % de las sales MS³³.

A los cuatro meses se cuantificó el número de hojas activas y el número de explantes vivos y se determinó el porcentaje de supervivencia por la fórmula:

$$\% \text{ de supervivencia} = \frac{\text{Número de explantes vivos}}{\text{Número de explantes iniciales}} \times 100$$

El experimento de crecimiento mínimo, se realizó con el objetivo de identificar las concentraciones de manitol (como regulador osmótico) y nitrato de plata ((inhibidor de etileno) que garanticen retardar el crecimiento de los explantes en conservación.

Se utilizó como Medio de cultivo basal (MB) las sales y vitaminas MS³³ al 75 % de su concentración y 20 g L⁻¹ de sacarosa. Los tratamientos fueron:

- I. MB
- II. MB + Manitol 10 g L⁻¹
- III. MB + Manitol 20 g L⁻¹
- IV. MB + Manitol 30 g L⁻¹
- V. MB + Manitol 40 g L⁻¹
- VI. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol 10 g L⁻¹
- VII. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol 20 g L⁻¹
- VIII. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol 30 g L⁻¹
- IX. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol 40 g L⁻¹
- X. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹)
- XI. Medio de cultivo multiplicación malanga³⁴

Todos los medios de cultivo se solidificaron con 4,7 g L⁻¹ de agar E (Biocen) y el pH se ajustó a 6,1 antes de la esterilización en autoclave.

Se emplearon 30 tubos de ensayo (150 x 25 mm) por tratamiento con 10 ml de medio de cultivo y un explante por tubo, se evaluaron 20 explantes por tratamiento.

Se evaluó a los ocho meses el número de hojas activas y el número de brotes. Los explantes obtenidos se cultivaron en medio de cultivo de multiplicación³⁴.

En los experimentos se aplicó un diseño completamente aleatorizado por entender homogéneas las condiciones de cultivo dentro de las cámaras y considerar como única fuente de variación los tratamientos.

Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Puesto que se encontró normalidad y homogeneidad de varianzas, con un nivel de significación de $p < 0.05$, los datos se procesaron mediante análisis de varianza de clasificación simple y la comparación múltiple de medias se realizó según la prueba de Tukey. Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS ver 25.0 para *Windows*.

Los resultados obtenidos se extendieron a otros cultivares de interés económico y de valor genético para mantener una colección de trabajo, los que mantuvieron resultados similares al cultivar objeto de estudio, no obstante, sería beneficioso para la investigación estudiar otros cultivares del género para corroborar el efecto del genotipo en la respuesta *in vitro*, así como realizar estudios de variabilidad genética.

RESULTADOS

Al estudiar las concentraciones de sales en el medio de cultivo (Tabla 1), podemos observar que en todos los tratamientos los explantes sobreviven por más de cuatro meses con buena vitalidad, no obstante, los mejores resultados se aprecian en el tratamiento donde se utiliza 100% de las sales MS, aunque con el 75 % de esta se observa 100 % de supervivencia y número de hojas activas (4,73) adecuado para la conservación *in vitro*.

Cultivar	Concentración de sales MS (%)	Supervivencia (%)	Número de hojas activas
'INIVIT MC – 2012' (<i>Colocasia esculenta</i>)	25	80,0	1,75 d
	50	93,3	2,92 c
	75	100	4,73 b
	100	100	6,13 a
Significación			0,000**

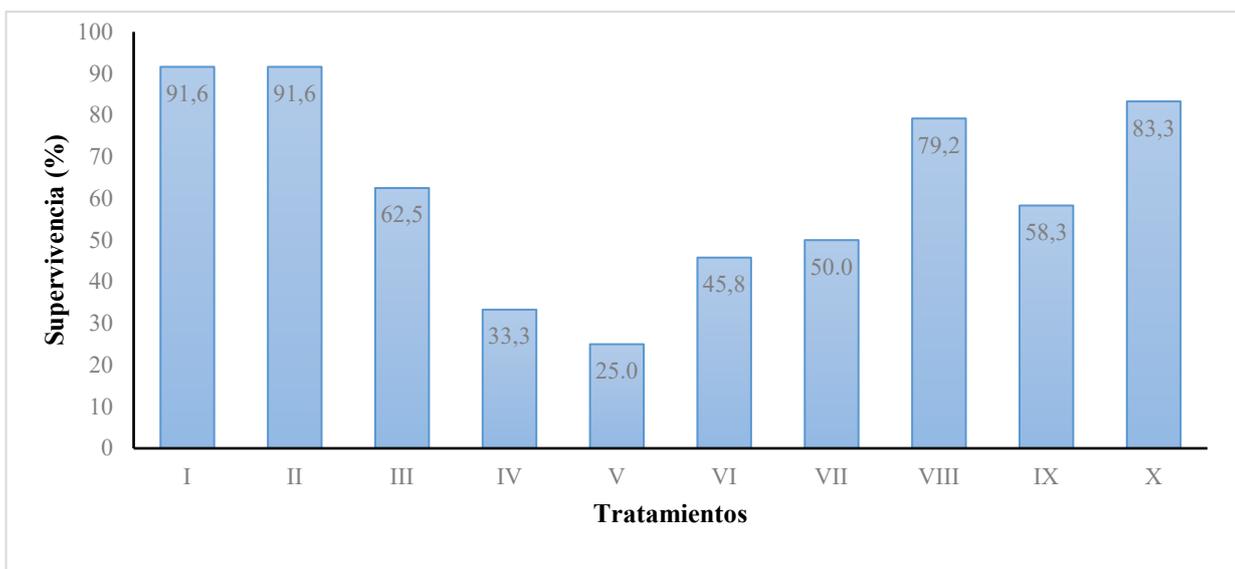
*Letra diferentes indican diferencias estadísticas para $p < 0.05$ según la prueba de Tukey

Leyenda: MS: Medio de Cultivo recomendado Murashige & Skoog³³

Tabla 1. Efecto de la concentración de sales en la conservación *in vitro* de *Colocasia esculenta*.

Los resultados obtenidos evidencian que es posible utilizar el 75 % de las sales MS³³ para la conservación *in vitro*, concentración que se acerca a la recomendada para la propagación *in vitro* de este género (80%)³⁴.

Al evaluar el efecto del manitol y el nitrato de plata, solos y combinados, sobre el crecimiento mínimo *in vitro* del cultivar de malanga 'INIVIT MC – 2012' en comparación con el medio de cultivo utilizado para la propagación *in vitro* de esta especie, podemos apreciar que en el medio de cultivo utilizado como control (XI) las plantas murieron a los 60 días, mientras que en todos los tratamientos fue posible mantenerlas con mayor o menor eficiencia durante ocho meses (Figura 1).



Leyenda: I. MB; II. MB + Manitol (10 g L⁻¹); III. MB + Manitol (20 g L⁻¹); IV. MB + Manitol (30 g L⁻¹); V. MB + Manitol (40 g L⁻¹); VI. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol (10 g L⁻¹); VII. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol (20 g L⁻¹); VIII. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol (30 g L⁻¹); IX. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol (40 g L⁻¹); X. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹)

Figura. 1. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la supervivencia de los explantes conservados de *Colocasia esculenta* a los ocho meses.

En cuanto al número de hojas, los mejores resultados se observaron en el tratamiento IV (Manitol 30 g L⁻¹) (14,88), sin diferencias estadísticas con el tratamiento I (Medio basal), pero sí con el resto de los tratamientos. Sin embargo, al analizar el número de brotes por explante este mismo tratamiento mostró los mayores valores (3,00), pero sin diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos.

No obstante, la supervivencia del material vegetal es uno de los aspectos más importantes, más cuando se trata de conservar un número pequeño de explantes por acesión. En nuestra investigación, la mejor supervivencia

se observó en los tratamientos I y II (91,60 %), en el tratamiento IV solo sobrevivió el 33,30 % del material inicial (Tabla 2).

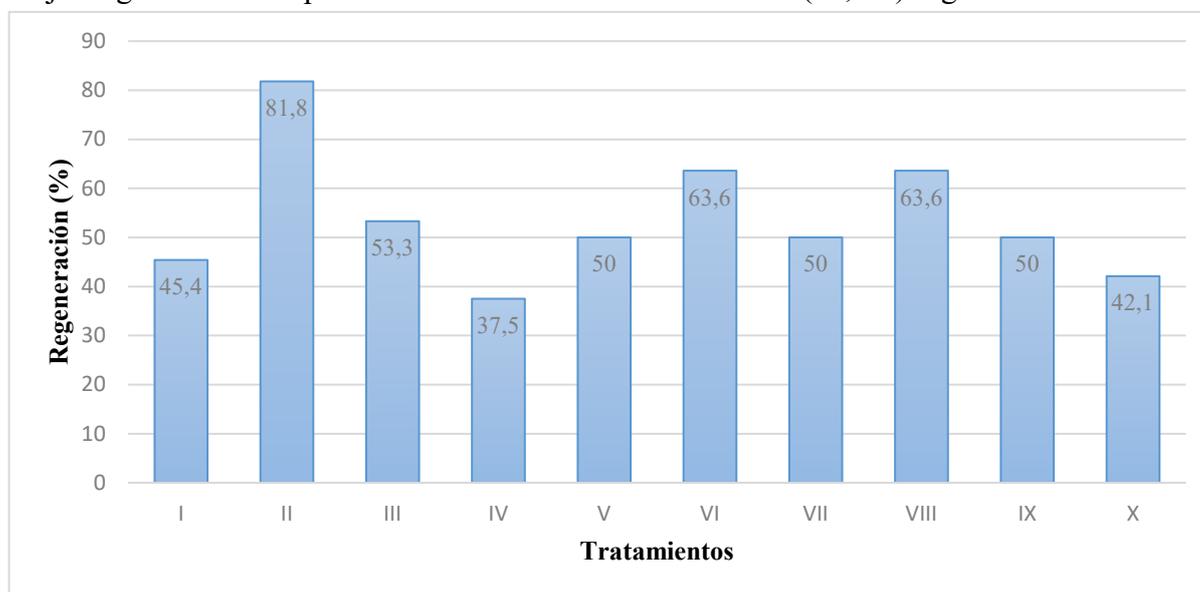
Tratamientos	Número de hojas	Número de Brotes
I. MB	8,82 ab	2,64 ab
II. MB + Manitol, 10 g L ⁻¹	5,91 b	2,14 ab
III. MB + Manitol, 20 g L ⁻¹	2,93 b	1,27 b
IV. MB + Manitol, 30 g L ⁻¹	14,88 a	3,00 a
V. MB + Manitol, 40 g L ⁻¹	6,00 b	2,50 ab
VI. MB + Nitrato de plata, 20 mg L ⁻¹ + Manitol, 10 g L ⁻¹	5,45 b	1,82 ab
VII. MB + Nitrato de plata, 20 mg L ⁻¹ + Manitol, 20 g L ⁻¹	4,85 b	1,69 ab
VIII. MB + Nitrato de plata, 20 mg L ⁻¹ + Manitol, 30 g L ⁻¹	3,16 b	1,58 ab
IX. MB + Nitrato de plata, 20 mg L ⁻¹ + Manitol, 40 g L ⁻¹	5,07 b	2,00 ab
X. MB + Nitrato de plata, 20 mg L ⁻¹	5,25 b	2,31 ab
g.l.	9	9
F	7,737	

*Letra diferentes indican diferencias estadísticas para p<0.05 según la prueba de Tukey

Leyenda: MB. Medio Basal

Tabla 2. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de malanga (*Colocasia esculenta*) a los ocho meses.

Por otra parte, una vez evaluados los tratamientos se colocaron en medio de cultivo de multiplicación y la mejor regeneración de plantas se observó en el tratamiento II (81,8%) Figura 2.



Leyenda: I. MB; II. MB + Manitol (10 g L⁻¹); III. MB + Manitol (20 g L⁻¹); IV. MB + Manitol (30 g L⁻¹); V. MB + Manitol (40 g L⁻¹); VI. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol (10 g L⁻¹); VII. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol (20 g L⁻¹); VIII. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol (30 g L⁻¹); IX. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹) + Manitol (40 g L⁻¹); X. MB + Nitrato de plata (20 mg L⁻¹)

Figura 2. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la regeneración de plantas a partir de explantes conservados de *Colocasia esculenta* a los ocho meses.

De todas las evaluaciones realizadas se pudo constatar que al utilizar entre 10 y 20 g L⁻¹ de manitol se obtuvieron hojas pequeñas y múltiples brotes, con una supervivencia del 91,6% y 81,8% de regeneración de plantas (Figura 3).



Figura 3. A. Plantas mantenidas *in vitro* en medio de cultivo con 10 mg.L⁻¹ de manitol y B. Regeneradas en medio de multiplicación.

Las plantas regeneradas de todos los tratamientos fueron aclimatizadas con un 100 % de supervivencia. En esta fase fue posible obtener coeficientes de multiplicación por encima de 2,00 en las plantas obtenidas. Los mejores valores se observaron en el tratamiento III (5,25) sin diferencias con el tratamiento II (4,70) (Tabla 3). No se observaron variantes fenotípicas en las plantas aclimatizadas.

Tratamientos	Supervivencia aclimatización	Multiplicación en aclimatización
I.MB	100	4,10 bc
II.MB + Manitol 10 g L ⁻¹	100	4,70 ab
III.MB + Manitol 20 g L ⁻¹	100	5,25 a
IV. MB + Manitol 30 g L ⁻¹	100	2,00 c
V. MB + Manitol 40 g L ⁻¹	100	2,33 c
VI. MB + Nitrato de plata (20 mg L ⁻¹) + Manitol 10 g L ⁻¹	100	4,00 bc
VII. MB + Nitrato de plata (20 mg L ⁻¹) + Manitol 20 g L ⁻¹	100	2,50 c
VIII. MB + Nitrato de plata (20 mg L ⁻¹) + Manitol 30 g L ⁻¹	100	2,00 c
IX. MB + Nitrato de plata (20 mg L ⁻¹) + Manitol 40 g L ⁻¹	100	2,50 c
X. MB + Nitrato de plata (20 mg L ⁻¹)	100	2,11 c
Sign		0.000
F		55,342
g.l.		9

*Letra diferentes indican diferencias estadísticas para $p < 0.05$ según la prueba de Tukey

Leyenda: MB. Medio Basal

Tabla 3. Efecto de los medios de cultivo en la supervivencia y multiplicación en la aclimatización de las plantas regeneradas de *Colocasia esculenta*.

Otros cultivares de interés económico y de valor genético se conservan *in vitro* en medio de cultivo que contiene 10 mg.L⁻¹ de manitol para mantener una colección de trabajo con fines de mejoramiento e intercambio de germoplasma, lo que permite su conservación durante 12 meses, sin necesidad de subcultivar.

Para la caracterización morfoagronómica se utilizaron 17 descriptores mínimos de los descriptores propuestos por Milián *et al.*, (2004) para esta especie y no se observaron variaciones fenotípicas.

DISCUSIÓN

Las estrategias de conservación *ex situ*, en campo, presentan el riesgo de pérdida por condiciones climáticas adversas, ataque de agentes patógenos, altos costos asociados al manejo agronómico, preparación de terreno, insumos y dificultad del manejo e intercambio de material²². Sin embargo, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales permiten mantener las plántulas en bancos de germoplasma *in vitro*, libres de patógenos, en espacio reducido, a bajo costo y condiciones controladas que facilitan el manejo a corto y largo plazo de material vegetal, así como el intercambio de germoplasma, particularmente, de especies con propagación vegetativa^{9,22}. Otro método de conservación es la criconservación donde los daños por congelación pueden causar ruptura de las paredes celulares si el protocolo no es estrictamente eficiente²².

En la presente investigación se utiliza solo el cultivar 'INIVIT MC – 2012', pero se prevee utilizar los resultados en estudios futuros con el resto de los cultivares del Banco de Germoplasma Cubano de la especie que se conserva en campo en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), con el objetivo de establecer un duplicado de este como estrategia para la conservación segura de esta fuente de genes a disposición de los mejoradores e incluir estudios de variabilidad genética de los cultivares conservados *in vitro* para completar la validación del protocolo.

Los resultados encontrados en esta investigación en cuanto al estudio de la concentración de sales en el medio de cultivo pueden ser utilizados en el resto de las accesiones del Germoplasma conservado *in vitro*, coinciden con otros autores⁹, quienes estudiaron concentraciones de las sales MS³³ en la conservación *in vitro* de *C. esculenta* var. 'Criolla' y obtuvieron resultados similares con supervivencia superior al 95 % al utilizar 75 % y 100 % de las mismas. Por otra parte, para la propagación *in vitro* de esta especie se utiliza el 80% de la concentración de sales MS²⁶.

Ramírez-Mosqueda & *al.*³⁵, en la conservación de *Laelia anceps* Lindl, tampoco encontraron diferencias estadísticas en la supervivencia de los explantes al utilizar las concentraciones de las sales al 100 y 75 %. Otros autores al conservar *in vitro* el clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) a partir de sales minerales, observaron que la disminución de hasta un 25 % de la concentración de las sales del medio de cultivo redujo la velocidad de crecimiento, pudiendo conservarse por un tiempo de seis meses en estas condiciones. Se obtuvo una supervivencia y recuperación del 91,3 %³⁶.

Sin embargo, la adición de otras sustancias que reducen los potenciales osmótico e hídrico pueden disminuir la adsorción de agua y nutrientes del medio de 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 nutrientes³⁷.

Los resultados de esta investigación reafirman los obtenidos en la conservación *in vitro* de *Xanthosoma* spp., donde se observó que 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 conservadas en medios de cultivo con manitol se recuperaron exitosamente²³.

Varios autores aseguran que el uso de osmorreguladores como el manitol, solo o combinado con otros, permite prolongar los periodos de subcultivo, y por ende la conservación efectiva de explantes, garantizando una tasa de crecimiento reducida del cultivo, así como un alto índice de supervivencia y viabilidad del material vegetal^{23,38,39}. Esto puede estar dado porque las plantas no tienen una ruta nativa para la biosíntesis de los alcoholes de azúcar (manitol y sorbitol) por lo que es difícil asimilarlos. Sin embargo, una vez traslocados, pueden ser metabolizados y utilizados⁴⁰, reduciendo el metabolismo y crecimiento de la planta *in vitro*. Además, se señala que la adición de manitol disminuye el potencial osmótico del medio de cultivo, y reduce la absorción de nutrientes, afectando el crecimiento, pero altas concentraciones de manitol (superiores a 25 g L⁻¹) puede tener consecuencias desfavorables para el desarrollo del explante, que reducen el vigor, número de brotes y supervivencia⁴¹.

El cultivo *in vitro* de la malanga *Colocasia* ha sido estudiado por varios autores, existen evidencias de que es un cultivo de alta estabilidad, se demostró que incluso después de numerosos subcultivos *in vitro* mantiene las características originales del cultivar⁴².

El almacenamiento de un clon de *Colocasia esculenta* a 28/24°C durante un fotoperiodo de 12 h en ausencia de manitol, no fue viable con intervalos de transferencia de más de ocho meses. El manitol tuvo un efecto positivo sobre la supervivencia a esta temperatura⁴³. En el protocolo propuesto se utilizan bajas concentraciones de manitol y composición simple del medio de cultivo, lo que justifica la baja probabilidad de que ocurra variación genética por esta vía. No obstante, sería prudente realizar evaluaciones a largo plazo para confirmar la estabilidad y viabilidad de las plantas conservadas.

Otros autores han realizado análisis moleculares después de la conservación *in vitro* y demostraron también su estabilidad⁴⁴. No obstante, es conveniente en los experimentos de conservación *in vitro* llegar hasta el estudio de la estabilidad genética del material conservado, lo que garantiza la seguridad de poder disponer de material genético con características de valor en los programas de mejoramiento genético del cultivo.

CONCLUSIONES

El protocolo de conservación *in vitro* desarrollado, utilizando un medio de cultivo con sacarosa al 2% y carbón activado al 0.2%, permitió conservar exitosamente el cultivar 'INIVIT MC-2012' de *Colocasia esculenta* durante 12 meses sin necesidad de subcultivo. Este protocolo, que induce un crecimiento lento y controlado de las plantas, minimizando el riesgo de variaciones somaclonales, se aplicó con éxito en la conservación de otros cultivares de interés económico.

La conservación *in vitro* de *C. esculenta* ofrece una alternativa viable para la preservación del germoplasma, el intercambio de material vegetal y el apoyo a programas de mejoramiento genético. Sin embargo, se requiere mayor investigación para evaluar la estabilidad genética a largo plazo en todos los cultivares y comparar la eficiencia de este método con otras estrategias de conservación.

Supplementary Materials: The following are available online at www.revistabionatura.com/xxx/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Contribuciones de los autores: Contribución de los autores: Conceptualización, Aymé Rayas Cabrera; Metodología, Aymé Rayas Cabrera, Arletys Santos Pino, Milagros Basail Pérez y Jorge López Torres; Validación, Aymé Rayas Cabrera y Jorge López Torres; Análisis formal, Aymé Rayas Cabrera y Arletys Santos Pino; Investigación, Aymé Rayas Cabrera y Arletys Santos Pino; Análisis de datos Aymé Rayas Cabrera, Arletys Santos Pino y Víctor R. Medero Vega; Escrito borrador del manuscrito, Aymé Rayas Cabrera y Arletys Santos Pino; Revisión y edición, Aymé Rayas Cabrera; Supervisión, Yoel Beovides García. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Esta investigación recibió financiación del Programa Nacional de Alimento Humano y su Agroindustria, financiado por el Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente (CITMA) a través del Proyecto “Conservación *in vitro* a mediano plazo de la variabilidad de raíces, rizomas y tubérculos tropicales de interés económico y social” (P131LH001167).

Agradecimientos: Los autores agradecen a los colegas que aportaron con su conocimiento para la versión final del manuscrito.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Macharia WM, Nuro MS, Muchugi AN, Palapala V. Genetic structure and diversity of East African Taro *Colocasia esculenta* L. *Afr. J. Biotechnol.* 2014, 139: 2950-2955. DOI: [10.5897/AJB2013.13030](https://doi.org/10.5897/AJB2013.13030)
2. Banjaw DT. Review of Taro (*Colocasia esculenta*) Genetics and Breeding *J Horticult* 2017, 4, 196. <https://doi.org/10.4172/2376-0354.1000196>
3. Hunt VH, Moot HM, Matthews PJ. Genetic data confirms field evidence for natural breeding in a wild taro population (*Colocasia esculenta*) in northern Queensland, Australia. *Genet Resour Crop Evol* 2013, 60: 1695-1707. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9952-1>
4. Chair H, Traore RE, Duval MF, Rivallan R, Mukherjee A, Aboagye LM, Van Rensburg WJ, Andrianavalona V, Pinheiro de Carvalho MAA, Saborio F., SriPrana M, Komolong B, Lawac F, Lebot V. Genetic diversification and dispersal of Taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). *PLoS ONE* 2016, 11: 1-19. doi: [10.1371/journal.pone.0157712](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157712)
5. Eleazu CO. Characterization of the natural products in cocoyam (*Colocasia esculenta*) using GC-MS. *Pharm. Biol.* 2016, 54:2880-2885. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1190383>
6. Ogali RE, Ofodile SE, Eze C. Comparison of bioethanol yield from four cocoyam species in Nigeria. *J. Chem. Soc. Niger* 2016, 41:53-57. <http://www.journals.chemsociety.org.ng/index.php/jcsn/article/view/47>
7. Rashmi DR, Anitha B, Anjum Sahair R, Raghu N, Gopenath TS, Chandrashekrappa GK, Kanthesh M, Basalingappa. An overview of Taro (*Colocasia esculenta*): A review. *Academia Journal of Agricultural Research* 2018, 6(10): 346-353, <https://doi.org/10.15413/ajar.2018.0144>
8. Yu JG, Liu P, Duan JA, Tang ZX, Yang Y. Itches—stimulating compounds from *Colocasia esculenta* (taro): Bioactive-guided screening and LC-MS/MS identification. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25:4382-4386. DOI: [10.1016/j.bmcl.2015.09.023](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.09.023)
9. Mancilla-Álvarez E, Ramírez-Mosqueda MA, Arano-Avalos S, Núñez-Pastrana R, Bello-Bello JJ. *In vitro* techniques to the conservation and plant regeneration of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Hortscience* 2019, 54(3):1-5. DOI:[10.21273/HORTSCI13835-18](https://doi.org/10.21273/HORTSCI13835-18)
10. Flores C R, Peñafil ME, Vallejo A. La malanga (*Colocasia esculenta*) y su efecto en la colesterolemia. Propuesta de galletas hipocolesteremicas. *RECIAMUC* 2021, 5(2): 327-335. <https://doi.org/10.26820/reciamuc/5>
11. Sintagma W, Rodríguez R, Lezcano P, Vargas J, Valle S. Efecto de la inocuidad del ensilado biológico de la papa china (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) para la alimentación de cerdos. *Rev Amaz Cienc Tecnol.* 2013, 2(3):162-171. ISSN-e 1390-5600
12. Caicedo QW, Rodríguez BR, Valle RS. Una reseña sobre el uso de tubérculos de papa china *Colocasia esculenta* conservados en forma de ensilaje para alimentar cerdos. *Rev. Electron Vet.* 2014, 15(1): 1-10. E-ISSN: 1695-7504 <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193036208010.pdf>
13. Caicedo QW, Rodríguez BR, Valle RS. Composición química y digestibilidad *in vitro* de ensilados de tubérculos de papa china (*Colocasia esculenta* L) destinados a la alimentación de cerdos. *Rev. Cuba Cienc. Agrícola.* 2015, 40(1):59-64. ISSN: 0034-7485
14. Aragadvay-Yungán RG, Núñez-Torres OP, Velástegui-Espín GP, Villacís-Aldaz LA, Guerrero-López JR. Uso de harina de *Colocasia esculenta* L., en la alimentación de cerdos y su efecto sobre parámetros productivos. *J. Selva Andina Anim. Sci.* 2016, 3(2): 98-104. ISSN 2311-2581 (on line edition)
15. Caicedo WO, Alves FN, Caicedo LG. Efecto del ensilado de tubérculos de taro (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) sobre indicadores productivos y reproductivos en cerdas F1 Landrace x Duroc. *Rev Inv Vet Perú* 2020, 31(2): e17830 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17830>
16. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
17. FAO. Malanga: Raíces y tubérculos. 2018. <http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP/FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro11/cap3.htm>

18. Offord CA. Germplasm conservation, In: Encyclopedia of applied plants sciences. 2017, 281–288.
19. Gantait S, El-Dawayati MM, Panigrahi J, Labrooy C, Verma SK. The retrospect and prospect of the applications of biotechnology in *Phoenix dactylifera* L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102:8229–8259. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9232-x>
20. Da Silva RL, Ferreira CF, da Silva Ledo CA, de Souza EH, da Silva PH, de Carvalho MAP, Souza FVD. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of *in vitro* conservation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2016, 127:123–133. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1035-0>
21. Pacheco G, Simao MJ, Vianna MG, Garcia RO, Vieira MLC, Mansur E. *In vitro* conservation of *Passiflora*—a review. *Scientia Hort.* 2016, 211:305–311. DOI: [10.1016/j.scienta.2016.09.004](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.004)
22. Bonilla M, Mancipe M, Aguirre M. *In vitro* conservation: A perspective for the management of phyto-genetic resources. *Rev. Investig. Agrar. Ambient.* (Bogota) 2015, 6:67–81. ISSN 2145-6097. DOI: [10.22490/21456453.1264](https://doi.org/10.22490/21456453.1264).
23. Rayas A, Cabrera M, Santos A, Basail M, López J, Medero V, Beovides Y. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma* spp.). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2013, XV(1): 167-171. [https://doi.org.10.15446/rev.colomb.biote](https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote)
24. Martínez, M. Conservación *in vitro* de germoplasma, un método para salvar el acervo genético en plantas. *Desde el Herbario CICY* 2021, 13: 83–86. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/ISSN: 2395-8790
25. Galvez D, Cabrera M, Beovides Y, Robaina A, Rodríguez S, Rodríguez D. Influencia de reguladores del crecimiento y el estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* ‘INIVIT MC 2001’. *Bioteconología Vegetal* 2013, 13 (4): 225 – 229. eISSN 2074-8647, RNPS: 2154
26. Santos A, Reinaldo D, López J, Basail M, Medero V, Gutiérrez Y, Rayas A, Beovides Y, Bauta M. Incremento de la eficiencia en el establecimiento *in vitro* de la malanga ‘INIVIT MC-2012’ (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.). *Rev Agricultura Tropical* 2015, 1 (1): 70-74. ISSN: 2517-9292
27. Medero VR, Basail M, Moreno O, Santos A, Rayas A, López J, Beovides Y, Rodríguez S, Maza N, Caballero W, Gutiérrez Y, Rodríguez D, Pons CC, Rodríguez D, Medero M. Empleo de la biotecnología para la producción de semilla categorizada en malanga. *Agricultura Tropical* 2016, 2(1): 52-60. ISSN: 2517-9292
28. Gutierrez Y, Folgueras M, Santos A, López J, Reinaldo D, Bauta M, López G, Alvarado-Capó Y. Protocolo para la propagación *in vitro* de *Colocasia esculenta* cv. ‘INIVIT MC-2012’. *Bioteconología Vegetal* 2017, 17(4): 237 - 244, eISSN 2074-8647, RNPS: 2154
29. Santos A, López J, Basail M, Gutiérrez Y, Rayas A, Medero, V, Rodríguez D, Rodríguez D, Beovides Y, Reinaldo D, Bauta M. Efecto de 6-BAP y AIA en el establecimiento *in vitro* de meristemos de *Colocasia esculenta* (L.) Schott cv. ‘INIVIT MC 2012’. *Bioteconología Vegetal* 2017, 17(1): 67-70. eISSN 2074-8647, RNPS: 215
30. Bogale A. Micropropagation of *Colocasia esculenta* (cv. Bolosso I) from corm and sprout tip explants. *J. Agric. Biotech. Sustain. Dev.* 2018, 10(7):147-156, <http://dx.doi.org/10.5897/JABSD2018.0305>
31. Santos A, Rayas A, Beovides Y, Medero V, Basail M. Effect of Coconut Water on *in Vitro* Multiplication of Taro Meristems Cultivar ‘INIVIT MC-2012’. *Mod Concep Dev Agrono.* 2018, 13(5). MCDA. 000823. DOI: 0.31031/MCDA.2024.13.000823
32. Medero VR, Rodríguez S, Basail M, Santos A, Rayas A, López J, Beovides Y, Rodríguez D, Torres M, Robaina A, Caballero W, Cruz JA, Bravo Y, Pons C, Medero M. 'INIVIT MC-2012': Nuevo clon de malanga *Colocasia* desarrollado por técnicas biotecnológicas. Memorias del XX Congreso Científico Internacional del INCA. Taller de Mejoramiento y Conservación de los Recursos Fitogenéticos 2016. <http://ediciones.inca.edu.cu/files/congresos/2016/CD/memorias/ponencias/talleres/MCF/ra/MCF-O.10.pdf>
33. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 1962, 15: 473-497. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
34. García M, Mederos V, Rodríguez S, López J, Ventura J, Cabrera M, Hernández R, González JE, Bermúdez D, Gálvez D, Gutiérrez V, Gálvez JR. Generalización de la metodología para la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. En: IBP (ed). Libro de reportes cortos del 5to coloquio internacional de Biotecnología vegetal 1999, 167-169. IBP, Santa Clara

35. Ramírez-Mosqueda MA, Cruz-Cruz CA, Atlahua-Temoxtle J, Bello-Bello JJ. *In vitro* conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. South African Journal of Botany 2019, 121: 219 –223. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.010>
36. Jiménez-Mariña L, Silva-Pupo JJ, Borges-García M, Fonseca-Arias M. Conservación *in vitro* del cultivo de Clavel español (*Dianthus caryophyllus*. l.) a partir de sales minerales. *Agron. Mesoam.* 2016, 27(1):177-181. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i1.21897>
37. Uribe Trimiño A. 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. 2010. 94 p.
38. Acosta K, García L. Conservación *in vitro* a corto plazo de ápices de plantas del híbrido de papaya ‘IBP 42-99’. *Bioteología Vegetal* 2005, 5(1): 47 – 50. eISSN 2074-8647, RNPS: 2154.
39. Carmona OE, Díaz LC, Beltrán JD. Efecto de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida* por el método de crecimiento mínimo. *Rev. Asoc. Col. Cienc. (Col.)* 2013, 25: 41-51 <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/19>
40. Thorpe T, Stasolla C, Yeung EC, de Klerk G-J, Roberts A, George EF. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Ed: George, E.G; M. A. Hall, Geert-Jan De Klerk. S 3rd Edition, 2008. volumen 1, ed: 115 -175
41. Montiel-Castelán P, Castillo-Martínez CR, Gómez-Reyes LA, Valle-Arizaga M, Jasso-Mata J. Conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de *Swietenia macrophylla* King, y *Tectona grandis* L. *Agroproductividad* 2016: 9(2): pp: 20-25.
42. Medero V, García M, Cabrera O, López J y Ventura JC. Generalización de la tecnología de micropropagación de la malanga a escala comercial. *Agrotecnia de Cuba*, 1997. 27 (2-3), 125-130.
43. Bessembinder JJE, Staritsky G & Zandvoort EA. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1993. 33(2): 121 127.
44. Hussain Z & Tyagi R. *In vitro* corm induction and genetic stability of regenerated plants in taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]. 2006. 5. 535-542.

Received: July 2, 2024 / **Accepted:** January 20, 2025 / **Published:** March 15, 2025

Citation: Rayas A, Santos A, Basail M, López J, Medero VR, Beovides Y. Conservación *in vitro* de *Colocasia esculenta* (Araceae) bajo condiciones de crecimiento mínimo. *Bionatura journal.* 2025;2(1):9. doi: 10.70099/BJ/2025.02.01.9

Additional information Correspondence should be addressed to rayasayme69@gmail.com; conserv.biotech@inivit.cu

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

ISSN.3020-7886

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Publisher's Note: Bionatura Journal stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2024 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).