

## Efecto del Cloruro de Sodio en el desarrollo *in vitro* de los cultivares 'Gran enano' y 'FHIA 03'

José de la C. Ventura, Luis Ruiz; Jorge López; Víctor Medero; Magaly García; Sergio Rodríguez; Manuel Cabrera, Marilys Milián, Nery Montano, Damisela Reynaldo, Marleny Torres, Dinorath Carvajal, Juan R. Gálvez, Jesús García y Julia Albert. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba.

### RESUMEN

Se determinó el efecto de niveles de Cloruro de Sodio en el desarrollo *in vitro* de los cultivares 'Gran Enano' (AAA) y 'FHIA 03' (AABB). El trabajo se desarrolló en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), durante los años 1998 - 2001. Se colocaron meristemos de 3 milímetros en el medio de cultivo M - 3, al que se le adicionaron diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio (NaCl) en un rango de 0 - 10 000 ppm. Se incubaron durante 40 días en cada subcultivo hasta los 80 días en que se evaluó finalmente, a una temperatura de  $25 \pm 27$  °C, DFFF  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, con un fotoperíodo de 16 horas al día y una humedad relativa del 85%. Los resultados mostraron que el grado de tolerancia al Cloruro de Sodio estaba muy influenciado por los genotipos utilizados. El cultivar 'Gran Enano' soportó con éxito hasta 4 500 ppm, con un porcentaje de explantes vivos del 96.7% y un 25% de afectación en hojas. El cultivar 'FHIA 03' presentó mayor tolerancia a niveles altos de sales, de 2 500 hasta 8 000 ppm obteniendo un porcentaje de supervivencia del 80.9%, aunque la afectación en las hojas fue de 72.5%. Se recomienda continuar estudios con genotipos puntuales que incluya a los principales clones comerciales y diploides para el mejoramiento genético.

Palabras clave: bananos, cultivo de tejidos, micropropagación, *Musa*.

### ABSTRACT

The effect of Sodium Chloride levels on *in vitro* development of "Gran Enano" (AAA) and 'FHIA 03' (AABB) cultivars was determined. Researches were carried out at "Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT)" from 1999 to 2001. Meristems (3 mm) were situated in M - 3 medium supplemented with different sodium chloride concentrations at a range of 0 - 10 000 ppm. They were incubated during 40 days in each subculture until 80 days when they were evaluated at  $25 \pm 27$  °C temperature, DFFF  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity a photoperiod of 16 hours per day and 85% relative humidity. Tolerance levels to sodium chloride are highly influenced by genotypes used. "Gran Enano" cultivar had success up to 4 500 ppm with a surviving of 96.7% and 25% damaged leaves. "FHIA 03" Hybrid showed tolerance to high salt levels from 2 500 to 8 000 ppm with 80.9% surviving but leaves were affected at 72.5%. Studies are recommended to continue with target genotypes including main marketable clones and diploids for genetic improvement.

Key words: bananas, micropropagation, *Musa*, tissue culture.

### INTRODUCCIÓN

La salinización del suelo conjuntamente con la erosión y el efecto negativo de dosis excesivas de fertilizantes químicos constituyen hoy los tres aspectos básicos del deterioro de los suelos y una de las temáticas de mayor actualidad en la lucha por la preservación de los recursos naturales, García (1995). Los excesos de sal actúan como un estrés ambiental, decreciendo el potencial de crecimiento y los rendimientos agrícolas de las plantas. La salinidad es uno de los estreses abióticos que más desequilibrios provoca en las plantas, entre los que se encuentran la absorción del agua, el metabolismo nitrogenado y la producción de metabolitos tóxicos. Reynaldo *et al.* (1998) y Ulisses *et al.* (1998), señalaron que en general, las plantas sometidas al estrés salino suelen acumular solutos en el citoplasma. Entre estos, la prolina es el más estudiado en plantas y tejidos

vegetales bajo estrés, pues está correlacionado al ajuste osmótico, pudiendo además ejercer control sobre el pH de la célula, proporcionando a la planta mayor tolerancia al estrés. En el cultivar de banano 'Nanicao', el número y tamaño de las yemas no fue afectado por los tratamientos salinos. Sin embargo, el aumento de los niveles de Cloruro de Sodio coincidió con el aumento en el contenido de prolina en las yemas. Parece ser que, de hecho, el aumento en la concentración de prolina en las yemas las hace capaces de contrarrestar el efecto del estrés, como ya ha sido descrito para otros cultivos González *et al.* (1998). Asimismo, se determinó que la longitud del sistema radical en el cultivo del arroz era el indicador que mostraba diferencias entre una variedad tolerante y una susceptible a partir de 4 000 ppm de sal. Mejorar la tolerancia a la salinidad puede hacerse a través de la selección de plantas que resistan con más efectividad las altas concentraciones de sal Shannon y Quaiset (1984). En

Cuba existen actualmente más de 1 000 000 ha de suelos afectados por las sales (14% de las áreas agrícolas) y 1 100 000 ha en peligro de salinizarse Ortega *et al.* (1986). Los estudios en *Musa spp.* resultan escasos, no obstante Borroto (1984), señaló que el cultivar 'Burro CEMSA' (ABB) resistía hasta 3 000 ppm en el suelo y el 'CEMSA 3/4' (AAB) hasta 2 000 ppm. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del Cloruro de Sodio en el desarrollo *in vitro* de los cultivares de banano y plátano 'Gran Enano' y 'FHIA 03', respectivamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del INIVIT entre los años en 1998 - 2001. Se tomaron meristemos de 3mm provenientes de plantas *in vitro* iniciadas de los cultivares 'FHIA 03' (AABB), probablemente resistente por su composición genómica balbisiana y el 'Gran Enano' (AAA), altamente susceptible (Borroto, 1984). Se empleó el medio de cultivo de iniciación M - 3 (Ventura, 1996) adicionándole 0; 500; 1 000; 1 500; 2 000; 2 500; 3 000; 3 500; 4 000; 4 500; 5 000; 6 000; 7 000; 7 500; 8 000; 9 000 y 10 000 ppm de Cloruro de Sodio reactivo (SIGMA). A cada tubo de ensayo (25 por 150 mm) se le agregaron 8 ml de medio de cultivo solidificado con  $7 \text{ mg.l}^{-1}$  de agar. Se incubaron en cámara de crecimiento a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  de temperatura, DFFF  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa y 85% de humedad relativa. Cada 40 días se efectuaron los subcultivos hasta los 80 días donde se realizaron las siguientes evaluaciones finales; porcentaje de explantes vivos; porcentaje de hojas afectadas; grados de oxidación (1 al 5) según la escala

de Novak (1989), donde cinco es la oxidación total; altura del explante (cm); grosor (cm); número de hojas (u); área foliar ( $\text{cm}^2$ ) (largo x ancho de la segunda hoja); número de yemas axilares por explantes (u), número de yemas adventicias (u) y peso fresco (g). En cada tratamiento fueron evaluados 30 explantes. Para analizar los resultados se aplicó Estadística Multivariada (Análisis de Grupos), (Grau, 1994).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cultivar "Gran Enano"

Se formaron tres grupos (Figura 1), en uno se agruparon las variantes de 0 a 4 500 ppm (III grupo), las que permitieron la obtención de las medias más bajas para las variables detractoras de esta investigación (25% de hojas afectadas y un grado de oxidación del explante de 4.71, según escala de Novak (1989), (Tabla 1) y arrojaron las medias más elevadas en las variables que favorecen el desarrollo del cultivo (96.7% de explantes vivos; 1.33 cm de altura; 0.3 cm de grosor; 2.94 hojas;  $0.96 \text{ cm}^2$  de área foliar; 0.9 yemas axilares; 0.76 yemas adventicias y 1.89 g de peso fresco). En el segundo grupo se agruparon los niveles de 5 000 a 8 000 ppm (63% de explantes vivos; 96.8% de hojas afectadas; un grado de oxidación del explante igual a 4.56; 0.6 cm de altura; 0.26 cm de grosor; 0.48 hojas;  $0.24 \text{ cm}^2$  de área foliar; 0.07 yemas axilares; 0.38 yemas adventicias y 0.35 g de peso fresco). Los niveles más altos formaron el grupo con la menor distancia genética (I grupo) con cero explantes vivos (Tabla 1). Resultados similares han sido informados por García (1995), pero en condiciones de campo.

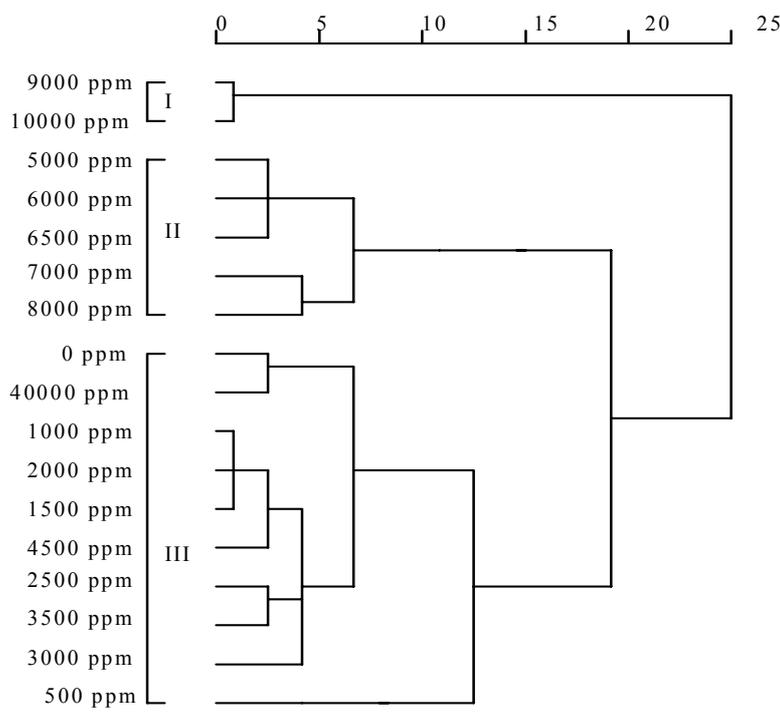


Figura 1. Formación de grupos en el cultivar 'Gran Enano' de acuerdo con la concentración salina.

Tabla 1. Comportamiento de las variables evaluadas en los agrupamientos formados de acuerdo con la concentración salina en el cultivar 'Gran Enano'.

Grupos	Porcentaje de explantes vivos	Porcentaje de hojas afectadas	Grados de oxidación	Altura (cm)	Grosor (cm)	No. de hojas	Area Foliar (cm <sup>2</sup> )	No. de yemas axilares	No. de yemas advent.	Peso fresco (g)
I (9000-10000 ppm)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
II (5000-8000 ppm)	63.00	96.80	4.56	0.60	0.26	0.48	0.24	0.07	0.38	0.35
III (0-4500 ppm)	96.70	25.00	4.71	1.33	0.30	2.94	0.96	0.90	0.76	1.89

### Cultivar 'FHIA 03'

Al igual que para el cultivar anterior se formaron tres grupos (Figura 2), pero a diferencia del cultivar 'Gran Enano', en éste se encontraron menos niveles de Cloruro de Sodio cercanos al control (0 ppm), con el que se agruparon sólo 500; 1 000; 1 500 y 2 000 ppm (III grupo) (100% de explantes vivos; 30% de hojas afectadas; un grado de oxidación del explante igual a 4.38; 1.36 cm de

altura; 0.36 cm de grosor; 2.24 hojas; 0.69 cm<sup>2</sup> de área foliar; 1.72 yemas axilares; 1.24 yemas adventicias y 0.22 g de peso fresco), (Tabla 2). En el segundo grupo se agruparon los niveles de 2 500 a 8 000 ppm (80.9% de explantes vivos; 72.5% de hojas afectadas; un grado de oxidación del explante igual a 4.42; 0.78 cm de altura; 0.32 cm de grosor; 0.79 hojas; 0.37 cm<sup>2</sup> de área foliar; 0.24 yemas axilares; 0.89 yemas adventicias y 4.35 g de peso fresco).

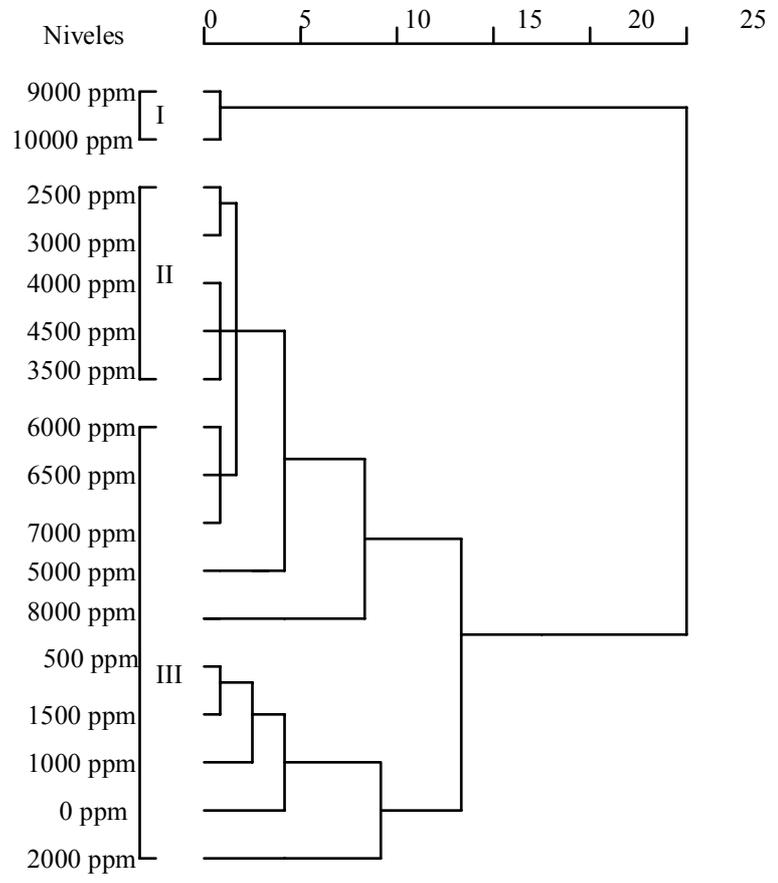


Figura 2. Formación de grupos en el cultivar 'FHIA-03' de acuerdo con la concentración salina.

Tabla 2. Comportamiento de las variables evaluadas en los agrupamientos formados de acuerdo con la concentración salina en el cultivar 'FHIA 03'.

Grupos	Porcentaje de explantes vivos	Porcentaje de hojas afectadas	Grados de oxidación	Altura (cm)	Grosor (cm)	No. de hojas	Area Foliar (cm <sup>2</sup> )	No. de yemas axilares	No. de yemas advent	Peso fresco (g)
I (9 000-10 000 ppm)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
II (2 500-8 000 ppm)	80.90	72.50	4.42	0.78	0.32	0.79	0.37	0.24	0.89	4.35
III (0-2 000 ppm)	100.00	30.00	4.38	1.36	0.36	2.24	0.69	1.72	1.24	0.22

Los niveles más altos formaron el grupo con la menor distancia genética (I grupo) con cero explantes vivos (Tabla 2). Se observó que en el cultivar 'FHIA-03' (Tabla 3), pese a que un menor número de niveles se agrupó con el control (0 ppm), sí, en los niveles más altos hubo mayor porcentaje de supervivencia que en el 'Gran Enano', donde en el segundo grupo sólo se obtuvo un 63% de explantes vivos, mientras que en el 'FHIA-03', 80.9% y con 8 000 ppm se obtuvo un 76% de explantes vivos y sólo 24% para el cultivar 'Gran Enano'; además de obtener con los niveles más altos de Cloruro de Sodio el mayor peso fresco (4.35

g), lo que significó una respuesta positiva de estas variables en dicho cultivar con valores más altos de Cloruro de Sodio; individualmente por niveles de 2 500 a 4 000 ppm se afectó menos del 70% de las hojas. Teniendo en cuenta que el cultivar 'FHIA 03' es considerado dentro del grupo de los plátanos tipo burros, estos resultados confirman en cierta medida los encontrados por Borroto, (1984) y Borroto *et al.* (1997), cuando señaló que el cultivar 'Burro CEMSA' (ABB) es un clon tolerante, ya que resiste hasta 3 000 ppm de sales en el suelo.

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia y afectación en hojas en los cultivares 'Gran Enano' y 'FHIA-03', con diferentes niveles de Cloruro de Sodio.

No.	Tratamiento	Porcentaje explantes vivos		Porcentaje afectación. en hojas	
		'G. Enano'	'FHIA-03'	'G. Enano'	'FHIA-03'
1	0 ppm	100.0	100.0	0.0	0.0
2	500 ppm	100.0	100.0	0.0	30.0
3	1 000 ppm	95.6	100.0	10.0	35.0
4	1 500 ppm	100.0	100.0	15.0	40.0
5	2 000 ppm	100.0	100.0	20.0	45.0
6	2 500 ppm	95.8	100.0	25.0	50.0
7	3 000 ppm	83.3	95.4	30.0	55.0
8	3 500 ppm	96.0	94.7	40.0	60.0
9	4 000 ppm	95.2	90.1	50.0	65.0
10	4 500 ppm	95.8	89.4	60.0	70.0
11	5 000 ppm	91.6	100.0	90.0	75.0
12	6 000 ppm	91.3	95.4	95.0	80.0
13	6 500 ppm	65.2	80.9	99.0	85.0
14	7 000 ppm	40.0	68.4	100.0	90.0
15	8 000 ppm	23.8	76.1	100.0	95.0
16	9 000 ppm	35.0	0.0	100.0	100.0
17	10 000 ppm	0.0	0.0	100.0	100.0

## CONCLUSIONES

El cultivar 'FHIA-03' presentó mayor tolerancia a la salinidad que el cultivar 'Gran Enano'; con concentraciones de Cloruro de Sodio de 2 500 a 8 000 ppm se obtuvo un alto porcentaje de supervivencia (80,9%) y el mayor peso fresco aunque el porcentaje de hojas afectadas fue superior al 70%.

El cultivar 'Gran Enano' soportó con éxito hasta 4 500 ppm con magníficas respuestas en todos los indicadores evaluados.

El grado de tolerancia a la salinidad evidenció estar fuertemente influenciado por los genotipos.

## RECOMENDACIONES

Continuar estudios en genotipos puntuales (diploides, triploides (AAB) y (ABB)) para determinar las dosis más apropiadas para la selección temprana de posibles mutantes.

## REFERENCIAS

- Borroto, M (1984) Estudio de salinidad en viandas tropicales.— Ciudad de la Habana: Instituto de Suelos (Conferencia Mimeo)
- Borroto, M, Borges, O, Gell, P, Saiz, J, y Méndez, A (1997) Plantas tolerantes a la salinidad en Cuba. Rev. Agrotécnia. de Cuba 27 (1): 62-68
- García, R (1995) Valores umbrales de la salinidad y exceso de humedad para los principales cultivos. Informe final del resultado.-p. 1 -15
- González, M C, Cristo E, Pérez N, García A (1998) Obtención de una nueva variedad de arroz tolerante al estrés hídrico y salino a partir del empleo de técnicas biotecnológicas. Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal.-- Habana: INCA,. --p.342
- Grau, R (1994) Maestría de computación.— Santa Clara: UCLV. Conferencias del paquete estadístico SPSS/PC<sup>+</sup>.— 9 p.
- Novak, F J (1989) Mutagénesis *in vitro* para el mejoramiento genético del banano y plátano (*Musa* spp.) Informe mensual UPEB 13(88-89): 62-80
- Ortega, F, Pena J y Castillo N (1986) La salinidad de los suelos de Cuba. Aspectos económicos globales. Ciencias de la Agricultura, 27: 137-144
- Reynaldo, Y, Echevarria Y, Jérez E, González M C (1998) Mecanismo *in vitro* de resistencia a la salinidad del somaclon de arroz 8480. Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal.— Habana: ICA. — p. 341
- Shannon, M C y Quaiset C O (1984) Benefits and limitations in breeding salt-tolerant crops. California Agriculture. 18:33-34
- Ulisses, C, Rocha P, Albuquerque C, Camara T R, Willadino L (1998) Determinación de prolina en yemas de plátano (*Musa* sp. cv Nanicao - AAA) seleccionadas *in vitro* en cuanto a la tolerancia a la salinidad. Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Habana: (UFRPE), Brasil. — p. 334
- Ventura, J de la C (1996) Medios de cultivo de implantación en la micropropagación *in vitro* del clon de banano 'Gran Enano'. — C. de la Habana. INIVIT. (Fondo Nacional de Manuscritos).,— p. 1-12