

Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos

Laisyn Posada Pérez*, Rafael Gómez Kosky, Maritza Reyes, Lizvadis Alvares Díaz. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-laisyn@uclv.etecsa.cu

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar las posibilidades de utilizar los RITA, en la micropropagación vía yemas axilares de la caña de azúcar y los bananos híbridos (*Musa sp.* AAAA cv. FHIA-01 y AAAB cv. FHIA-18). Para el caso de la caña de azúcar en la etapa de multiplicación se evaluaron dos medios de cultivo, los cuales fueron utilizados para la multiplicación y engrosamiento en dos variedades. Se estudió además el número de explantes iniciales a emplear (dos, cuatro y seis), usando como control frascos con explantes en medios de cultivo semisólido y líquido. Se determinó el momento para efectuar el cambio de medio de cultivo, empleando dos tiempos, a los 15 y 30 días, así como el número de inmersiones en 24 horas que se debían hacer. Similares variables fueron estudiadas para el caso de los bananos, con excepción del medio de cultivo. Se obtuvo como medio de cultivo más adecuado para caña de azúcar el de multiplicación con dos explantes, en las dos variedades empleadas, no presentando diferencias significativas los tiempos de cambio de medio de cultivo efectuados a los 15 y 30 días. Para el caso de los bananos el empleo de cinco explantes para FHIA-01 y tres o cinco explantes para FHIA-18 iniciar la multiplicación permitió alcanzar los mejores resultados. Respecto al número de inmersiones presentó mayor superioridad el tratamiento de tres inmersiones durante 24 horas, para ambos cultivares de banano.

Palabras clave: medio de cultivo líquido, micropropagación, *Musa*, *Saccharum*

ABSTRACT

The present work had as objective to study the possibilities to use the RITA, in the micropropagation plant via axillary buds of sugarcane and of the banana hybrid (*Musa sp.* AAAA cv. FHIA-01 and AAAB cv. FHIA-18). Two different culture medium i.e. multiplication and thickening were studied in the multiplication phase of two varieties of sugarcane. It was also studied the number of initial explants to use (two, four and six), using as control flasks with explants liquid and semisolid medium. The number of immersions in 24 hours was analysed and also the time for culture media change was determined testing two periods, 15 days and 30 days respectively. Similar variables were studied for the case of the banana cultivar except for the medium culture. It was obtained like half of more appropriate cultivation for sugarcane that of multiplication with two explants, in the two used varieties, not presenting significant differences the times of change of half made to the 15 and 30 days. For the case of the banana cultivar employment of five explants for FHIA-01 and three or five explants for FHIA-18 to begin the multiplication allowed to reach the best results. Regarding the number of immersions it presented bigger superiority the treatment of three immersions during 24 hours, for both banana cultivars.

Keys words: liquid medium, micropropagation, *Musa*, *Saccharum*

INTRODUCCIÓN

La micropropagación es uno de los métodos de multiplicación de plantas de más amplio uso comercial, debido a los altos coeficientes de propagación que se obtienen en corto tiempo. Esto permite una mayor rapidez en la introducción de variedades o cultivares, de mayor calidad al producir poblaciones uniformes de plantas libres de enfermedades (Pérez *et al.*, 1998). Sin embargo, los procedimientos son de una intensa laboriosidad, debido al número de manipulaciones manuales que implica y los costos de producción relativamente altos, ya que para su aplicación se requieren de un alto componente de mano de obra calificada.

El uso del medio de cultivo líquido para el cultivo *in vitro* tiene varias ventajas y es considerado una

técnica ideal para la producción a gran escala porque reduce las manipulaciones y simplifica los cambios de medios de cultivo. La limitación mayor es la hiperhidricidad, un gran desorden fisiológico causado parcialmente por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos (Etienne y Berthouly, 2002). Para evitar esto, varios procedimientos han sido desarrollados: canasta flotante para soportar las plantas encima del líquido estancado, añadir un medio de cultivo líquido estancado, añadir un medio líquido a cultivos establecidos o practicar cultivos en "neblina" (Escalona, 2000).

Se ha encontrado que el mejor método es que se sumerjan temporalmente los tejidos en el medio de cultivo líquido en lugar de continuamente. Este método fue desarrollado por Alvard *et al.* (1993) para

la micropropagación de bananos y plátanos, siendo también adaptado para el cultivo de embriones somáticos por Escalant *et al.* (1994). Aitken (1991) también utilizó un tipo de sistema de inmersión temporal para la propagación del *Pinus*. A raíz de esto se desarrollaron diferentes técnicas y varios tipos de frascos de cultivo más o menos complejos los cuales han dado resultados exitosos en la micropropagación de varias especies por microcortes o embriogénesis somática, después de una considerable reducción del tiempo de inmersión (Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1995, Escalona, 2000 y Gómez *et al.*, 2000).

Tomando en cuenta lo anterior es que se desarrolló el presente trabajo que tuvo como objetivo estudiar el empleo de los sistemas de inmersión temporal RITA en la multiplicación *in vitro* de brotes de caña de azúcar y bananos, vía organogénesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se emplearon explantes axilares de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) de las variedades Cuba 214-85 y el somaclón IBP 89-112, los cuales tenían dos subcultivos. Para el caso del banano (*Musa* sp.) se utilizaron iguales explantes, de los híbridos tetraploides FHIA-01 (AAAA) y FHIA-18 (AAAB). Todos provenientes de medio de cultivo de multiplicación semisólido (agar 6 g.l⁻¹).

Caña de Azúcar

Con el objetivo de determinar cual sería el medio de cultivo más adecuado para la etapa de multiplicación en los Sistemas de Inmersión Temporal, se desarrollaron dos ensayos con los siguientes medios de cultivo: multiplicación, propuesto por Jiménez (1995) y engrosamiento Gómez (1996), los cuales se combinaron con tres números de explantes iniciales (dos, cuatro y seis) en las dos variedades estudiadas.

Una vez determinado el medio de cultivo adecuado, se evaluó el efecto del número de explantes iniciales a emplear por RITA, para lo cual se evaluaron cinco tratamientos formados por dos, cuatro y seis explantes y como controles explantes en medio de cultivo de multiplicación semisólidos y líquido según Jiménez (1995). También se estudió el momento adecuado para el cambio de medio de cultivo empleando dos tiempos (a los 15 y 30 días de cultivo), así como el número de inmersiones durante 24 horas (dos, tres y cuatro veces, de un minuto de duración cada una).

Para inocular los RITA se utilizaron explantes individuales, a los cuales se les eliminaron

previamente las hojas abiertas. Se emplearon como repeticiones cinco RITA por tratamiento. En todos los experimentos para las evaluaciones finales se tuvo en cuenta el número de brotes formados.

Bananos

Se estudió el número de explantes iniciales por RITA (tres y cinco) en el cultivar FHIA-01. A continuación se estudiaron dos tipos de manejos (planta *in vitro* decapitada y planta *in vitro* decapitada y seccionado longitudinalmente en el cormo); el número de inmersiones durante 24 horas (dos, tres y cuatro veces) y por último la influencia del estado físico del medio de cultivo de proveniencia (semisólido y líquido en RITA).

Con el empleo del cultivar FHIA-18 (AAAB) se determinó primeramente el número de explantes iniciales, en igual número que para el caso anterior y posteriormente la frecuencia de inmersión (tres y cuatro veces en 24 horas) sobre la base de los resultados obtenidos en el cultivar FHIA-01.

El tiempo de inmersión fue de un minuto, igual que el utilizado en los experimentos con caña de azúcar.

En todos los experimentos se utilizaron como controles, explantes en medio de cultivo estático en frascos de cultivo de vidrio de 250 ml de capacidad, en estado semisólido (6.0 g.l⁻¹ de agar, con 30 ml de medio de cultivo por frasco) y también líquido (10 ml de medio de cultivo por frasco) como se emplean en la micropropagación convencional.

Como repeticiones fueron utilizado cinco RITA por experimento, los cuales fueron repetidos dos veces. Para el caso de la frecuencia de inmersión, los experimentos fueron realizados en el tiempo y se utilizaron como réplicas 10 RITA.

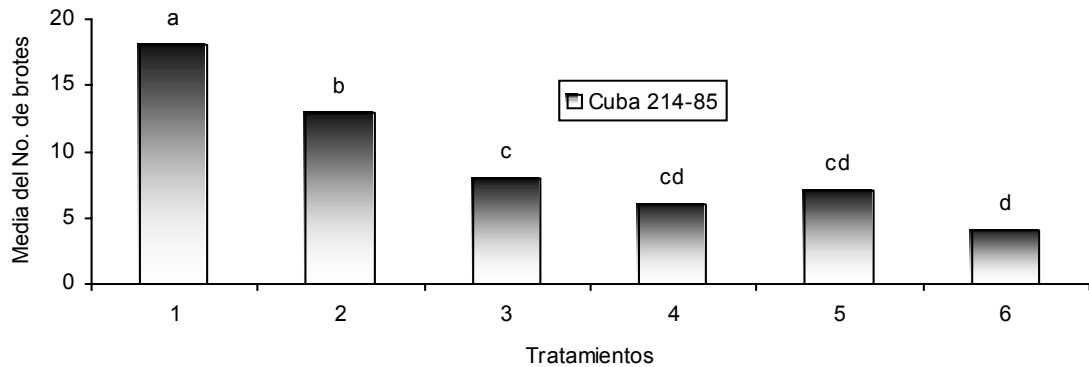
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caña de Azúcar

Al analizar la interacción medio de cultivo y cantidad de explantes, se obtuvieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos y una respuesta muy similar en ambas variedades de caña de azúcar (Cuba 85-214 e IBP 89-112). Los mayores coeficientes de multiplicación se obtuvieron al emplear el medio de cultivo de multiplicación y dos explantes por RITA, al inicio del cultivo *in vitro* (Figuras 1 y 2); además se logró un mayor vigor de las plantas, así como un color verde más intenso de las hojas. En ambos experimentos se alcanzó en el mejor tratamiento un coeficiente de multiplicación de 18.75 independiente de la variedad estudiada. Lorenzo *et al.* (1998) demostraron que empleando sistemas de inmersión temporal de mayor capacidad (10 litros)

formados por dos botellones, se obtuvo una clara estimulación en la formación de brotes de caña de azúcar y en el largo de los mismos, lo cual apoya

los resultados obtenidos en el presente trabajo. El coeficiente de multiplicación alcanzado por estos autores fue de 23.9.



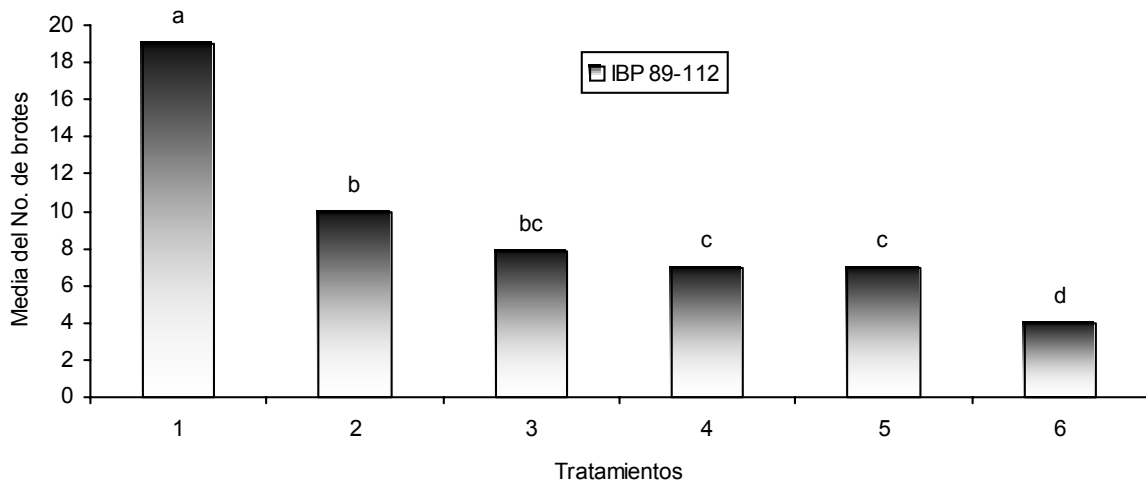
Letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.01$ según prueba de rangos múltiples de Duncan. Media general: 7.32, Coeficiente de Variación: 25.38%.

Tratamientos

1-Medio de Cultivo Multiplicación y 2 explantes
2-Medio de Cultivo Multiplicación y 4 explantes
3-Medio de Cultivo Multiplicación y 6 explantes

4-Medio de Cultivo Engrosamiento y 2 explantes
5- Medio de Cultivo Engrosamiento y 4 explantes
6- Medio de Cultivo Engrosamiento y 6 explantes

Figura 1. Efecto de la interacción entre el medio de cultivo y el número de explantes iniciales en la multiplicación en RITA de la variedad de caña de azúcar Cuba 214-85.



Letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.01$ según prueba de rangos múltiples de Duncan. Media general: 7.14, Coeficiente de Variación: 27.95%.

Tratamientos:

1- Medio de Cultivo Multiplicación y 2 explantes
2- Medio de Cultivo Multiplicación y 4 explantes
3- Medio de Cultivo Multiplicación y 6 explantes

4- Medio de Cultivo Engrosamiento y 2 explantes
5- Medio de Cultivo Engrosamiento y 4 explantes
6- Medio de Cultivo Engrosamiento y 6 explantes

Figura 2. Efecto de la interacción entre el medio de cultivo y el número de explantes iniciales en la multiplicación en RITA de la variedad de caña de azúcar IBP 89-112.

Los resultados que se muestran en la tabla 1 ratifican una vez más que la cantidad adecuada inicial de explantes para los RITA en caña de azúcar, es de dos al comienzo del cultivo, con un comportamiento muy superior al resto de los tratamientos y con diferencias significativas. La explicación a esto puede estar dada por la competencia entre los explantes

por el espacio o puede ser debido a las condiciones de oxigenación, las cuales son mayores con menos explantes en el RITA. Además con el empleo de estos sistemas es posible aumentar el coeficiente de multiplicación entre cinco a seis veces en relación con el medio de cultivo de multiplicación estático: semisólido y líquido.

el mejor resultado se logró con cinco explantes iniciales, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 3a). No ocurriendo lo mismo en

el cultivar FHIA-18, donde fue igual iniciar el subcultivo de multiplicación con tres o cinco explantes por RITA para el comienzo del cultivo *in vitro* (Tabla 3b).

Tabla 3a. Influencia del número de explantes sobre la multiplicación de los bananos en los RITA.

Cultivar	Número de Explantes Iniciales	Coeficiente de Multiplicación	
FHIA-01	3	2.3	b
	5	3.3	a
Control en M. semisólido	10	1.0	c
Control en M. líquido	10	1.2	c

Valores con letras distintas difieren significativamente $p < 0.05$ según prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tabla 3b. Influencia del número de explantes iniciales sobre la multiplicación de los bananos en los RITA.

Cultivar	Número de Explantes Iniciales	Coeficiente de Multiplicación	
FHIA-18	3	6.8	a
	5	6.1	a
Control en M. de cultivo semisólido	10	2.5	c
Control en M de cultivo Líquido	10	2.8	c

Valores con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$, según prueba de rangos múltiples de Duncan.

Para la variable manejo *in vitro* de los explantes, se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Al utilizar el decapitado solamente, el coeficiente de multiplicación fue de 2.26. Mientras que para el tratamiento donde las plantas *in vitro* fueron decapitadas y seccionadas longitudinalmente en el cormo fue de 4.2 todo esto en el cultivar FHIA-01. Orellana (1995) señaló la importancia del manejo para la multiplicación de bananos y plátanos, con resultados muy superiores que al emplear distintos tipos de medios de cultivo coincidiendo con los resultados del presente trabajo.

La frecuencia de inmersión es una de las variables más importantes a determinar cuando se trabaja con sistemas

de inmersión temporal. En ambos cultivares la frecuencia de tres veces cada 24 horas durante un minuto resultó superior al resto de los tratamientos evaluados (Tabla 4). Igual frecuencia de inmersión plantearon Alvard *et al.* (1993) para otros cultivares de banano.

Etienne *et al.* (1997) emplearon en el cultivo del café (*Coffea sp.*) para la multiplicación de microestacas en sistemas de inmersión temporal una frecuencia de cuatro veces cada 24 horas de 15 minutos de duración. Mientras que para el caso de la multiplicación de brotes, de *Syngonium* a partir de yemas axilares se logró utilizando una frecuencia de inmersión de tres veces en 24 horas con una duración de cinco minutos según Gómez (1996).

Tabla 4. Efecto de la frecuencia de inmersión en RITA sobre la multiplicación *in vitro* de banano.

Cultivar	Número de Explantes	Número de Inmersiones en 24	Coeficiente de Multiplicación
	Iniciales	horas	
FHIA-01	5	2	3.5 b
	5	3	5.0 a
	5	4	1.8 c
FHIA-18	5	3	6.3 a
	5	4	2.8 b

Valores con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según prueba de rangos múltiples de Duncan.

También tuvo una influencia en el aumento del coeficiente de multiplicación del cultivar FHIA-01, el estado físico del medio de cultivo de procedencia del material inicial. Siempre que se utilizó para el

inoculación de los RITA explantes provenientes de medio de cultivo líquido de RITA en el subcultivo anterior, los coeficientes fueron mayores con valores entre 5.2-5.4. No siendo así al utilizar explantes que

venían de medio de cultivo semisólido donde los coeficientes estuvieron entre 3.3-3.6. Esto demostró la ventaja del uso del RITA para la multiplicación empleando medios de cultivo líquidos, pues elimina una de las desventajas del uso de los mismos de forma estática, que es la disminución del coeficiente de multiplicación con sucesivos subcultivos.

CONCLUSIONES

La mejor combinación para lograr altos coeficientes de multiplicación en la caña de azúcar empleando los RITA lo constituyó, utilizar el medio de cultivo de multiplicación propuesto por Jiménez (1995) y dos explantes al inicio del cultivo de las variedades Cuba 85-214 e IBP 89-112 y con una frecuencia de inmersión de tres veces al día durante un minuto.

El medio de cultivo líquido en los RITA, puede permanecer hasta 30 días sin ser cambiado, sin que esto afecte la multiplicación de los explantes de caña de azúcar, lo cual puede disminuir los riesgos de contaminación.

Los mejores resultados para la multiplicación de los cultivares de banano FHIA-01 y FHIA-18 se alcanzaron con la combinación de cinco explantes iniciales y una frecuencia de inmersión de tres veces durante un minuto cada 24 horas.

El empleo de los RITA para el caso de los cultivares de banano permitió alcanzar coeficientes de 5.0 para el FHIA-01 y 6.3 para el FHIA-18 muy superiores a cuando se utilizó medio de cultivo estático.

REFERENCIAS

Aitken-Christie J (1991) Automation En: Debergh, PC y Zimmerman, RJ (Eds) Micropropagation: Technology and Application, pp 363-388. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Alvard D, Cote F y Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion. Plant Cell Tissue and Organ Culture 32: 55-60

Etienne H, Lartaud M, Ferriere N, Carron M, Berthouly M y Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg) using the temporary immersion techniques. *In vitro* Cell Development Biol. 33: 81-87

Etienne H y Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69: 215-231

Escalant JV, Teisson C y Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro* Cell.Dev. Biol Plant 30:181-186

Escalona MM (2000) Propagación de la piña (*Annanas comosus* (L) Merr) en Sistemas de inmersión temporal. Tesis presentada para optar por el grado a doctor en Ciencias Agrícolas. Ciego de Avila, pp.92

Gómez KR (1996) Memorias del "I Curso Internacional de Semilla sintética o artificial". Capítulo 1. Generalidades sobre el cultivo *in vitro*: sus aplicaciones en especies tropicales de importancia económica. p 100-109

Gómez KR, Gilliard T, Barranco LA (2000) Somatic embryogenesis in liquid medium. Maturation and enhancement of germination of the hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB). InfoMusa. Vol.9 (1) 12-14

Jiménez GE (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 100 p.

Lorenzo JC, González BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P y Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture 54: 197-200

Murashige T y Skoog FS (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol 5: 173-197

Orellana PP (1995) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas. IBP. 100p.

Pérez PJ, Orellana PR, Suárez MC y Valdés CM (1998) Propagación masiva en Biofábricas. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, pp 241-250. IBP, Santa Clara.

Teisson, C y Alvard D (1995) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Immersion. En: M Terzi *et al.* (eds) Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology pp. 105-110. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht