

Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la micropropagación de la yuca en Sistema de Inmersión Temporal

Milagros Basail*, Víctor Medero, Marilyn Martínez, José de la C. Ventura, Jorge López, Magaly García, Manuel Cabrera, Arletys Santos, Aymé Rayas, Carmen Pons, Maricel Bauta, Miguel Álvarez y Jesús García. *Autor para correspondencia.

RESUMEN

La necesidad de producir material vegetal de plantación de alta calidad, disponible para los productores de yuca ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos de propagación *in vitro* y su automatización, como el uso de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA®). El presente trabajo fue desarrollado con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación en la propagación masiva de la yuca en Sistemas de Inmersión Temporal. Se utilizó el clon 'CMC-40'. Se estudiaron diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante y densidad de material vegetal por unidad a una misma frecuencia de inmersión. Se obtuvieron los resultados más elevados en el coeficiente de multiplicación al utilizar 20 ml de volumen de medio de cultivo al emplear una densidad de 40 explantes/frasco. Estos resultados utilizando los Sistemas de Inmersión Temporal permitieron establecer una metodología más eficiente para la micropropagación de la yuca y la producción de vitroplantas de mayor calidad para la fase de enraizamiento, y posterior aclimatización a condiciones de campo.

Palabras clave: cultivo de tejidos, medio de cultivo líquido, *Manihot esculenta* Crantz

ABSTRACT

Due to the need of producing high quality planting material available to cassava growers, it has been necessary to look for alternatives in order to increase the efficiency of *in vitro* propagation methods and their automation, such as the use of the Temporal Immersion Systems (RITA®). This work was carried out to increase the multiplication coefficient for cassava mass propagation through out Temporal Immersion Systems. The clone 'CMC-40' was used. Different medium volumes per explant, and material density per unit at a given Immersion frequency were tested. The highest results were obtained in the 2.8 multiplication coefficient with 20 ml culture medium volume and 3.2 using a density of 40 explants/flask. When the Temporal Immersion System is used with these results, a more efficient method for cassava micropropagation is established and also higher quality vitroplants for the rooting stage and further acclimatization in field conditions are produced.

Key Words: Tissue Culture, liquid culture medium, *Manihot esculenta* Crantz

INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) constituye en la actualidad un cultivo de gran importancia por su amplia utilización en la alimentación humana, animal y otros fines industriales; sin embargo los rendimientos que se obtienen aún no satisfacen las necesidades crecientes de esta raíz tuberosa.

El sistema de multiplicación por organogénesis directa a escala comercial está limitado principalmente por su intensa labor y altos costos de producción; a consecuencia del elevado número de operaciones manuales requeridas (Ziv, 1999). Además, desde el punto de vista biológico la micropropagación por yemas axilares ofrece bajos coeficientes de multiplicación (Jiménez, 1998). No obstante, la organogénesis constituye un sistema que asegura la estabilidad genética de las plantas regeneradas (Pérez *et al.*, 1998), y por lo tanto se hace necesario una mayor explotación de las reservas que aun poseen los mismos.

Los Sistemas de Inmersión Temporal constituyen una tecnología más accesible, que permite el empleo de medios de cultivo líquidos sin efectos colaterales; ya que están basados en un contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes (Teisson *et al.*, 1996).

En Cuba se ha diseñado un sistema, bajo el mismo principio, con ventajas respecto al RITA®, que ha sido aplicado con resultados importantes en un grupo de cultivos de interés económico (Escalona, 1999). En yuca, el uso de estos equipos se ha descrito para incrementar los porcentajes de germinación de los embriones somáticos (Medero *et al.*, 2000) y para la propagación masiva *in vitro* por yemas axilares (Medero *et al.*, 2000a.) Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo se realizó con el objetivo de incrementar el coeficiente multiplicación en la propagación masiva de la yuca en Sistemas de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de los experimentos fueron utilizados como explantes, microestacas

procedentes de vitroplantas del clon 'CMC-40'. Se utilizó el Sistema de Inmersión Temporal compuesto por dos frascos de cristal de 5 litros de volumen total, uno como frasco de cultivo para los explantes y el otro como reserva del medio de cultivo.

Para la determinación del volumen de medio de cultivo por explante se utilizaron tres volúmenes (10, 20 y 40 ml/explante) del medio de cultivo MS + 1 mg.l⁻¹ de Tiamina + 20 g.l⁻¹ de Sacarosa + 0.04 mg.l⁻¹ de 6-Bencilaminopurina + 0.05 mg.l⁻¹ de Ácido Giberélico. Se emplearon 40 explantes por tratamiento. Se estudiaron dos densidades de explantes (40 y 80 explantes/frasco).

En ambos experimentos se utilizó un tiempo de inmersión de 10 minutos a una frecuencia de 6 horas. Las evaluaciones se llevaron a cabo a los 30 días de cultivo, donde se evaluaron las siguientes variables: longitud del explante (cm), número de entrenudos por explante, número de hojas activas por explante, peso fresco por explante (g) y coeficiente de multiplicación. Se realizaron dos repeticiones por tratamiento.

Todos los tratamientos fueron incubados a 28 ± 2.0 °C de temperatura, intensidad luminosa de 3 500

umol m⁻²s⁻¹ y fotoperíodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad.

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente según el diseño, el cual consistió en la aplicación de una prueba de hipótesis para muestras independientes en los casos que se compararon dos tratamientos y análisis de varianza de clasificación simple (completamente al azar) para comparar varios tratamientos. La comparación múltiple de media se realizó según la prueba de Duncan (Lerch, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la determinación del volumen de medio de cultivo por explante los tratamientos de 20 y 40 ml/explante presentaron el comportamiento más favorable (Tabla 1), sin diferencias estadísticas entre ellos en cuanto a las variables número de entrenudos, número de hojas activas y peso de la masa fresca, pero sí con respecto al otro tratamiento. En cuanto a la longitud del explante el tratamiento de 20 ml/explante alcanzó el mayor valor (8.31 cm) con diferencias estadísticas respecto al resto.

Tabla 1. Resultados del efecto del volumen del medio de cultivo sobre las variables evaluadas en el clon de yuca 'CMC - 40'.

Tratamientos	Longitud del explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. de Hojas Activas	Peso promedio (g)
10 m/explante	3.54 c	2.95 b	1.75 b	0.05 b
20 ml/explante	8.31 a	4.30 a	2.10 a	0.20 a
40 ml/explante	6.84 b	4.00 a	2.20 a	0.20 a
ES ±	0.33 *	0.18 *	0.19 *	0.01 *
CV (%)	20.50	18.80	7.80	21.00

Letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan.

En la figura 1, se reflejan los resultados obtenidos respecto al coeficiente de multiplicación, donde la variante de 20 ml por explante mostró los mejores

resultados sin diferencias significativas con la variante de 40 ml por explante y sí con diferencias estadísticas con la variante de 10 ml por explante.

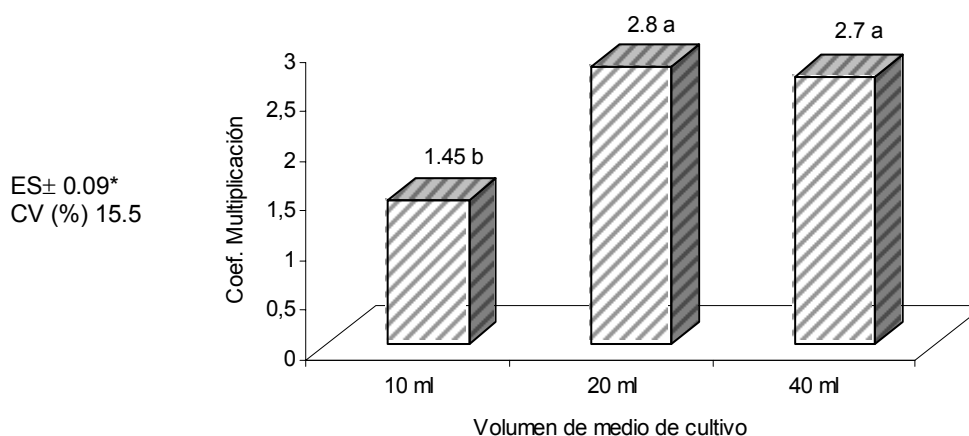


Figura 1. Efecto del volumen de medio de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación en yuca, clon 'CMC - 40'.

Al respecto Lorenzo *et al.* (1998) estudiaron el efecto del volumen de medio de cultivo por explante sobre la formación de brotes de caña de azúcar en Sistemas de Inmersión Temporal, encontrando una mayor tasa de multiplicación con 50 ml por explante. Estos autores señalaron que al aumentar la cantidad de medio de cultivo por explante se incrementó la disponibilidad de nutrientes; sin embargo elevadas cantidades de medio de cultivo disminuyeron el número de brotes.

Escalona *et al.* (1998), señalaron que a medida que se aumentó la disponibilidad de medio de cultivo en la

micropropagación de piña se logró un coeficiente de multiplicación mayor; pero este decreció cuando las cantidades de medio de cultivo eran excesivamente grandes en comparación con el material vegetal presente en el sistema.

En el experimento densidad de explantes (Tabla 2), se puede observar que el mejor resultado se obtuvo con la densidad de 40 explantes por frasco con los mayores valores numéricos y con diferencias estadísticas para la variable longitud del explante (15.87 cm).

Tabla 2. Efecto de la densidad de explantes sobre las variables evaluadas en el clon de yuca 'CMC - 40'.

Tratamientos	Longitud del explante (cm)	# Entrenudos por explante	No. de Hojas Activas	Peso promedio (g)
40 explantes	15.87	4.80	2.45	0.69
80 explantes	11.43	4.38	2.17	0.64
T	-4.77 **	0.34 ns	-1.82 ns	1.46 ns

En la figura 2, se puede observar que para la variable coeficiente de multiplicación, al utilizar 40 explantes

por frasco superó de forma significativa a 80 explantes, con un índice de multiplicación de 3.2 respecto a 2.7.

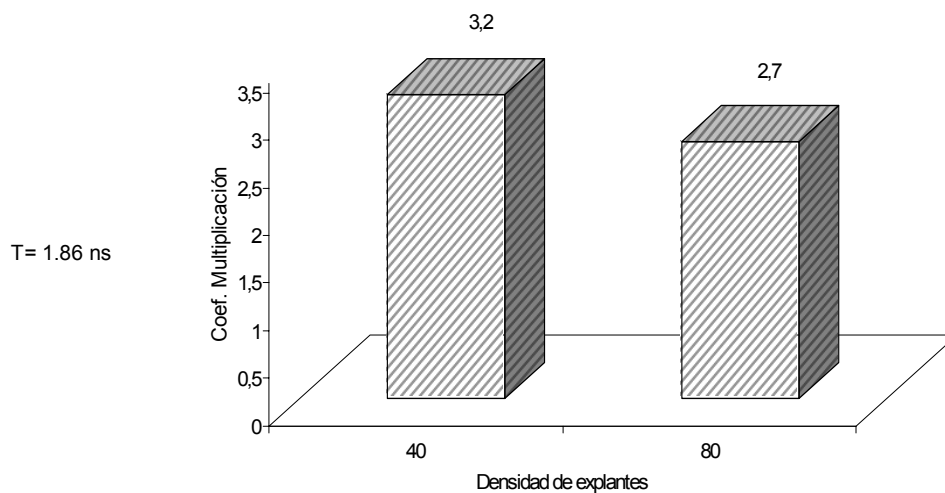


Figura 2. Efecto de la densidad de explantes sobre el coeficiente de multiplicación en yuca, clon 'CMC - 40'.

Orellana (1998), puntualizó la necesidad de valorar experimentalmente la densidad de explantes por frasco porque este parámetro pudiera ocasionar deficiencias en el sistema; ya que una baja densidad ocasionaría pérdidas de espacio y medio de cultivo, y con ello la subutilización de los recipientes; mientras que una alta densidad propiciaría un crecimiento limitado de los brotes e insuficiente proliferación con subcultivos más frecuentes.

De Fera *et al.* (1998), recomendaron para recipientes de 3.8 litros de capacidad una densidad de 40 brotes de caña de azúcar por frasco, lo cual les permitió obtener mayor coeficiente de multiplicación (10.92) y un peso promedio de 5.74 mg por brote.

De forma general los experimentos desarrollados permitieron establecer una metodología eficiente que incrementa de forma significativa el coeficiente de multiplicación en yuca, basada en la Inmersión Temporal de los explantes (Figura 3).

La superioridad del nuevo método entre otros aspectos está dada por el empleo del medio de cultivo en estado líquido, que a diferencia del semisólido facilita el aumento de la asimilación de los nutrientes por los explantes. Además, en estos sistemas los explantes no están constantemente en contacto con el medio de cultivo sino, sólo a determinada frecuencia y un período corto de tiempo que permite la renovación constante de la atmósfera interna de los frascos y evita la acumulación de gases nocivos como el etileno, así como facilita la regulación de la concentración

de CO₂ y mejora la oxigenación de los tejidos. Los explantes retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de los nutrientes, lo

cual se traduce en un crecimiento más vigoroso y mejor desarrollo. Además, estos aspectos positivos del SIT, favorecen la fotosíntesis de las plantas (Teisson y Alvard, 1997).

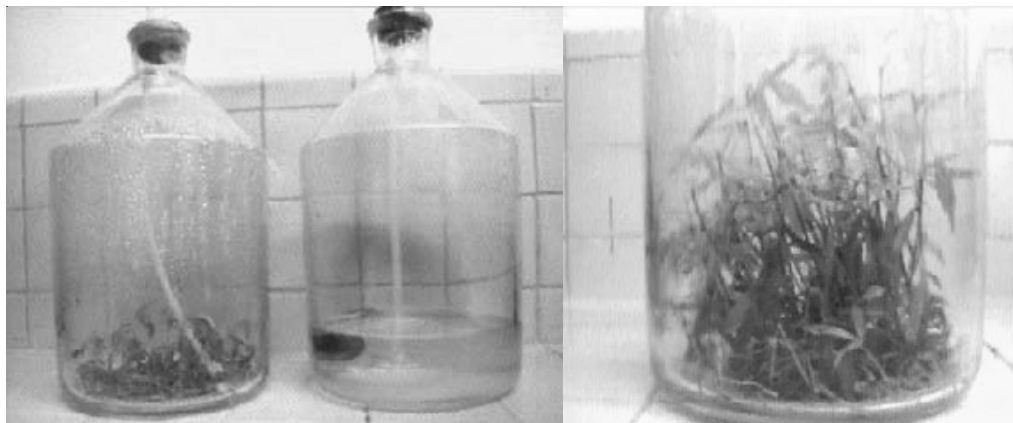


Figura 3. Resultados de la propagación *in vitro* de la yuca en el Sistema de Inmersión Temporal a los 40 días de cultivo, clon 'CMC – 40'.

REFERENCIAS

- De Feria, M, Jiménez E y Chávez M (1998). Influencia de la densidad de inóculo y la frecuencia de renovación del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) utilizando Sistemas de Inmersión Temporal. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REBIO'98. 1-5 Junio, La Habana, Cuba. Libro de Resúmenes. p. 42
- Escalona, M, Lorenzo J, González J, Daquinta M, Borroto C y Espinosa P (1998). Algunos factores que afectan la proliferación de plantas en Sistemas de Inmersión Temporal. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REBIO'98. 1-5 Junio, La Habana, Cuba. Libro de Resúmenes. p. 42
- Escalona, M (1999). Propagación de la Piña (*Ananas Comosus* (L.) Merr) en Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis para optar al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Ciego de Ávila, Cuba
- Jiménez, E (1998). Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y Mejora genética de Plantas por biotecnología, pp. 13-22. IBP, Santa Clara
- Lerch, G (1977). La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. La Habana, (Ed) Científico-Técnico
- Lorenzo, J, González B, Escalona M, Teisson C, Espinosa P y Borroto C (1998). Sugarcane shoots formation in an improved Temporary Immersion System. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 54: 197-200
- Medero, VR, Rodríguez S, Borroto C, Gómez R, López J y García M (2000). Sistema para embriogénesis somática en clones cubanos de yuca (*Manihot Esculenta*, Crantz). Proceeding Cassava Biotechnology Iv International Scientific Meeting, pp. 408 - 419. CBN, Brasilia
- Medero, VR, López J, García M y Ventura J De La C (2000a). Multiplicación *in vitro* de la yuca en Sistemas de Inmersión Temporal. XII Seminario Científico del Inca. Libro de Resúmenes XII Seminario Científico del INCA. p.162
- Orellana, P (1998). Propagación vía organogénesis. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y Mejora genética de Plantas por biotecnología, pp. 151-176. IBP, Santa Clara
- Pérez, J, Jiménez E y Agramonte D (1998). Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y Mejora genética de Plantas por biotecnología, pp. 179-190. IBP. Santa Clara
- Teisson, C, Alvard D, Berthouly B, Cote F, Escalant J, Etienne H y Lartaud M (1996). Simple apparatus to perform plant tissue culture by Temporary Immersion. Acta horticulturae. 440: 521-526
- Teisson, C y Alvard D (1997). RITA and apparatus for application of Temporary Immersion in Plant Tissue Culture. Bioveg' 97. Advances techniques applied to mass Clonal Propagation of Plants
- Ziv, M (1999). Plant propagation and mechanized separation of organogenic clusters from bioreactor cultures. Resúmenes del Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. Bioveg '99. Ciego de Ávila, Cuba. p. 22