

Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la propagación *in vitro* del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistemas de Inmersión Temporal

Milagros Basail Pérez^{1*}, Rafael G. Kosky², Víctor Medero Vega¹, Eneida Otero Gálvez¹, Marlenys Torres Delgado¹, Manuel Cabrera Jova¹, Jorge López Torres¹, Magaly García García¹, Arletys Santos Pino¹, Aymé Rayas Cabrera¹, José de la C. Ventura Martín¹, Maricel Bauta Toledo¹, Miguel Álvarez Mesa¹, Eriker Páz Chávez¹, Yoel Beovidez García¹, Julia Albert Llerena¹, Alexis Ortega Ortiz, Alberto Espinosa Cuéllar¹, Jesús García Ruiz¹ *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6, Santo Domingo, CP 53 000, Villa Clara, Cuba. e.mail: milagrosb@inivit.co.cu

² Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830

RESUMEN

La necesidad de producir material vegetal de plantación de alta calidad ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos de propagación *in vitro* y su automatización. El presente trabajo fue desarrollado con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación en la propagación masiva del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) mediante el empleo de Sistemas de Inmersión Temporal. Se estudió el efecto de diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante y densidades de material vegetal por frasco de cultivo a una misma frecuencia de inmersión. Los resultados más elevados en el coeficiente de multiplicación se obtuvieron al utilizar 40 ml de volumen de medio de cultivo por explante y una densidad de 70 explantes/frasco con 14.99 y 16.02 respectivamente. Esto permitió incrementar el número de plantas *in vitro* y su calidad para pasar a las fases de enraizamiento y aclimatización.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, híbrido, medio de cultivo líquido

ABSTRACT

The need of producing high quality planting material has required the searching of new alternatives to increase the efficiency of *in vitro* propagation methods and their automation, such as Temporary Immersion Systems. This work has been carried out to increase the multiplication coefficient in mass propagation of hybrid 'FHIA-21' (AAAB) in Temporary Immersion Systems. Different culture medium volumes per explant and densities of planting materials per unit were studied at the same immersion frequency. The highest multiplication coefficient rate, (14.99 and 16.02 respectively), was obtained when 40 ml culture medium volume were used at a density of 70 explants/flask. The use of Temporary Immersion System allowed increasing the multiplication coefficient in hybrid 'FHIA-21' (AAAB) and the highest quality multiplication coefficient for rooting stage and further acclimatization in field conditions.

Key words: hybrid, liquid culture medium, multiplication coefficient

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) son una fuente importante de alimento para una gran parte de la población mundial que se localiza principalmente en países en vías de desarrollo de Asia, África, América Central y del Sur.

El sistema de multiplicación *in vitro* por organogénesis directa que se emplea a escala comercial está limitado, principalmente, por su intensa labor y altos costos de producción; a consecuencia del elevado número de operaciones manuales que son requeridas (Ziv, 1999). Además, desde el punto de vista biológico la propagación *in vitro* por yemas axilares ofrece bajos coeficientes de multiplicación (Jiménez, 1998).

El cultivar híbrido 'FHIA 21' (*Musa* AAAB) fue desarrollado por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) y tiene entre sus características principales el alto potencial productivo y la resistencia parcial a la Sigatoka negra. Sin embargo, su propagación por técnicas biotecnológicas se ve limitada por el bajo coeficiente de multiplicación.

El cultivo en inmersión temporal puede constituir una vía alternativa para la propagación *in vitro* a corto plazo. Además, es una tecnología que permite el empleo de medios de cultivo líquidos sin efectos colaterales ya que se basa en un contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes (Ettienne y Berthouly, 2002) y ha sido utilizado para la propagación de diferentes

genotipos de *Musa*. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo se realizó con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación en la propagación masiva del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) mediante el uso de Sistemas de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal para los experimentos se utilizaron plantas *in vitro* de 'FHIA-21' (AAAB), procedentes del banco de germoplasma de plátanos y bananos del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) que se encontraban en fase de multiplicación.

Como Sistema de Inmersión Temporal se dispuso de dos frascos de cultivo de 10 litros de capacidad, uno para el crecimiento del material vegetal y el otro como reservorio de medio de cultivo.

El efecto del volumen de medio de cultivo por explante (brotes individuales) se determinó a través de cuatro tratamientos (20, 30, 40 y 60 ml/explante). Se utilizó el medio de cultivo basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) al que se adicionaron 2.0 mg.l⁻¹ de 6-Belcilaminopurina (6-BAP); 0.65 mg.l⁻¹ de ácido indolacético (AIA); 30.0 g.l⁻¹ de sacarosa; 10.0 mg.l⁻¹ de ácido ascórbico y 1.0 mg.l⁻¹ de paclobutrazol (PBZ). Se emplearon 50 explantes por tratamiento.

Además se evaluaron cuatro densidades de explantes (30, 50, 70 y 90 explantes/frasco de cultivo). Para ello se utilizó el medio de cultivo antes mencionado a razón de 40 ml/explante.

En ambos experimentos se empleó un tiempo de inmersión de diez minutos cada tres horas. Las evaluaciones se llevaron a cabo a los 21 días de cultivo, donde se evaluaron las siguientes variables: coeficiente de multiplicación, diámetro del pseudotallo (cm), grado de oxidación, según escala de Novak *et al.* (1994),

número de hojas activas y altura del explante (cm). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

El coeficiente de multiplicación se calculó de la siguiente forma:

$$CM = \frac{\text{Número de explantes obtenidos en el frasco de cultivo a los 21 días}}{\text{Número de explantes adicionados al frasco de cultivo}}$$

Todos los tratamientos fueron incubados a 27±2°C con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 62-68 μmol.m⁻².s⁻¹ y fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

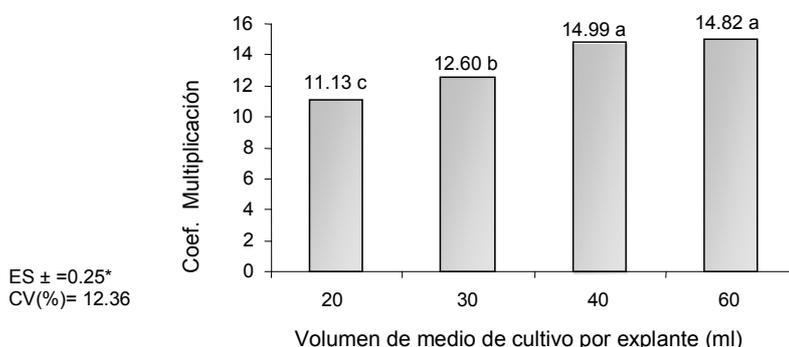
Con los criterios de estadística descriptiva se realizaron las figuras y tablas que expresan los resultados procesados. La comparación múltiple de media se realizó según Tukey (Lerch, 1977). Se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El volumen de medio de cultivo tuvo influencia sobre el coeficiente de multiplicación. Los mejores resultados se observaron cuando se emplearon 40 ml y 60 ml de medio de cultivo por explante, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 1).

Para el resto de las variables evaluadas estos mismos tratamientos (40 y 60 ml/explante) presentaron la respuesta más favorable (Tabla 1), sin diferencias significativas entre ellos en cuanto a las variables diámetro del pseudotallo, grado de oxidación, número de hojas activas y altura del explante.

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 y encontraron 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.



Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren para p<0.05 según prueba de Tukey.

Figura 1. Efecto del volumen de medio de cultivo por explante sobre el coeficiente de multiplicación en el cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal a los 21 días de cultivo.

Según Castro y González (2002) para lograr un desarrollo en las técnicas de cultivo de tejidos es necesario proveer a las plantas con suficientes cantidades de nutrientes esenciales (incluyendo la sacarosa y carbono como fuentes de energía bajo condiciones heterotróficas), de tal manera que los nutrientes no sean un factor limitante para la multiplicación en el desarrollo de las plantas. De acuerdo con los resultados obtenidos en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden demostraron que con el empleo de un volumen de 500 ml de medio de cultivo con nueve explantes se logró un elevado coeficiente de multiplicación de 10.5 brotes y la mejor calidad de los brotes en términos de una mayor producción de masa seca.

Al respecto Ziv (2005) al utilizar 1 250 ml de medio de cultivo (62.5 ml/explante) en biorreactores de 2 500 ml de volumen total obtuvo un elevado coeficiente de multiplicación (15.10) con la adición de 20 explantes en bananos 'Grande naine'.

Con respecto a la densidad de explantes por frasco se comprobó que para la variable coeficiente de multiplicación la adición de 70 explantes con un volumen de 40 ml de medio de cultivo por explante

superó de forma significativa a los demás tratamientos y se alcanzó un coeficiente de multiplicación de 16.02 (Figura 2). Igualmente, con esta densidad se observaron los mayores valores numéricos en cuanto al diámetro del pseudotallo y altura del explante. Para el grado de oxidación se obtuvo el menor valor sin diferencias significativas con el tratamiento dos (50 explantes) al igual que con el número de hojas activas sin diferencias con el tratamiento cuatro (90 explantes) pero sí con el resto (Tabla 2).

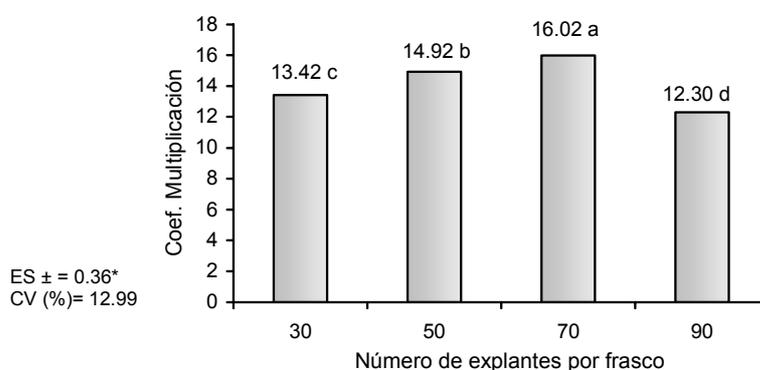
En el cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA), empleando los sistemas de inmersión temporal de 1 litro de capacidad, Albany (2001) señala que la variable que determina un incremento en el coeficiente de multiplicación, peso de los brotes, peso final y peso útil, es la densidad de inóculo, y obtuvo los mejores resultados con 25 explantes por frasco.

De forma general los experimentos desarrollados permitieron incrementar de forma significativa el coeficiente de multiplicación en el cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal (Figura 3).

Tabla 1. Efecto del volumen de medio de cultivo sobre diferentes variables evaluadas en el cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) a los 21 días de cultivo en Sistema de Inmersión Temporal (10 litros de capacidad).

Tratamientos (ml/exp.)	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	Hojas Activas	Altura (cm)
20	0.72 b	3.30 a	2.98 b	1.50 b
30	0.70 b	3.10 a	3.01 b	1.86 b
40	0.97 a	2.61 b	3.00 a	1.40 b
60	0.99 a	2.69 b	3.03 a	1.79 b
ES ±	0.03 *	0.10*	0.13 *	0.06 *
CV (%)	16.14	13.55	15.54	12.10

Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0.05$ según prueba de Tukey.



Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0.05$ según prueba de Tukey.

Figura 2. Efecto de la densidad de explantes por frasco sobre el coeficiente de multiplicación en el cv. híbrido 'FHIA 21' (AAAB) a los 21 días de cultivo en Sistema de Inmersión Temporal de 10 litros de capacidad.

Tabla 2. Influencia de la densidad de explantes por frasco sobre diferentes variables evaluadas en el cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) a los 21 días de cultivo en Sistema de Inmersión Temporal.

Tratamientos (# de explantes)	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	Hojas Activas	Altura (cm)
30	0.74 c	4.05 a	3.25 a	1.38 b
50	0.98 b	2.40 c	3.03 a	1.48 b
70	1.10 a	2.35 c	2.07 b	1.64 a
90	0.83 c	3.90 b	2.35 b	1.08 c
ES ±	0.03 *	0.12 *	0.08 *	0.11 *
CV (%)	18.20	15.11	13.01	16.54

Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0.05$ según prueba de Tukey.



Figura 3. Resultados de la propagación *in vitro* del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en el Sistema de Inmersión Temporal a los 21 días de cultivo con un volumen de medio de cultivo de 40 ml por explante y una densidad de 70 explantes por frasco de cultivo .

CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados en el trabajo permitieron demostrar que es posible multiplicar el cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal con el empleo de un volumen de medio de cultivo de 40 ml/explante y una densidad de 70 explantes/frasco de cultivo, lo que garantizó la mejor respuesta de los explantes en cuanto al coeficiente de multiplicación y sin síntomas de hiperhidricidad ni presencia de yemas adventicias.

REFERENCIAS

Albany, N (2001) Efectos de retardantes del crecimiento en la micropropagación de bananos en medios de cultivo líquidos en agitador orbital y sistemas de inmersión temporal. Tesis para optar por el Grado Científico de Master en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara.

Castro, D, González J (2002) Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. Agricultura sostenible 62 (1): 68-78

Ettienne, H, Berthouly M (2002) Temporary Immersion System in plan micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54:197-200

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. Ed. Científica y Técnica. La Habana. p. 288

Lorenzo, J, González B, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved Temporary Immersion System. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 197-200

Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-479

Novak, F, Afza R, Duren M (1994) Field evaluation of tissue-culture bananas in grade oxidation. Australian Journal of Experimental Agriculture 30: 569-574