

Multiplicación *in vitro* de plátano vianda cv. 'INIVIT PV-2011' (*Musa AAB*) en Sistemas de Inmersión Temporal

Milagros Basail Pérez*, Víctor Medero Vega, Yenisey Gutiérrez Sánchez, Marlenys Torres Delgado, Jorge López Torres, Arletys Santos Pino, Aymé Rayas Cabrera, Maricel Bauta Toledo, Yoel Beovidez García, Alexi Ortega Ortiz. *Autora para correspondencia

Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo. Villa Clara, Cuba. CP 53 000 e-mail: sit.biotec@inivit.cu

RESUMEN

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) con el objetivo de multiplicar el cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV-2011' (*Musa AAB*) en Sistemas de Inmersión Temporal (frascos Nalgene® de 10.0 litros de capacidad). Se determinó el efecto del tiempo de inmersión (10, 20 y 30 minutos), la frecuencia de inmersión (cada tres, seis y ocho horas), el volumen de medio de cultivo por explante (20, 40, 60 y 80 ml), el tiempo de subcultivo (15, 18, 21 y 25 días) y la densidad inóculo de explantes por frasco (20, 40, 60 y 80 explantes/frasco de cultivo). Los resultados permitieron establecer un tiempo de inmersión de 10 minutos con una frecuencia de inmersión cada tres horas, 60 explantes por frasco, 60 ml de medio de cultivo por explante y subcultivo a los 18 días para multiplicar en SIT este cultivar. Se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 8.5 y material vegetal con adecuadas características.

Palabras clave: densidad de explantes, frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión

In vitro multiplication of plantain cv. 'INIVIT PV-2011' (*Musa AAB*) in Temporary Immersion System

ABSTRACT

The work was developed in the laboratory of Plant Biotechnology at Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) with the aim of multiplying the plantain cultivar 'INIVIT PV-2011' (*Musa AAB*) in Temporary Immersion Systems (10.0 liters Nalgene bottles). The effect of immersion time (10, 20 and 30 minutes), the frequency of immersion (three, six and eight hours), the volume of culture medium per explant (20, 40, 60 and 80 ml), subculture time (15, 18, 21 and 25 days) and the inoculum density explants per bottle (20, 40, 60 and 80 explants / culture flask) were determined. The results allowed to establish an immersion time of 10 minutes with a frequency of immersion every three hours, 60 explants per bottle, 60 ml of culture medium and subculture explant at 18 days for multiplying this cultivar. A multiplication coefficient of 8.5 and plant material with suitable characteristics were obtained.

Keywords: explants density, immersion frequencies, immersion time, multiplication

INTRODUCCIÓN

El cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (*Musa AAB*) posee alto potencial de rendimiento y buena adaptabilidad. Las plantas presentan una altura de 2.30 m, el número de frutos promedio/racimo es de 45 dedos, el color del pseudotallo es verde con tonalidades rosadas y el color de los frutos es verde. El peso neto de los racimos sin raquis oscila entre 17.0 y 20.0 kg y el grosor de los frutos es aproximadamente de 15 cm. Sin embargo, existe poca disponibilidad de semilla lo cual dificulta el establecimiento de plantaciones. Por

ello, una de las vías rápidas de obtener semilla de alta calidad sería la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos.

En estudios previos desarrollados en el INIVIT se ha logrado multiplicar en condiciones *in vitro* en medio de cultivo semisólido con un coeficiente de 1: 3.5. No obstante, se podría incrementar si se emplearan Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) con los cuales se han demostrado resultados positivos con otros cultivares de *Musa* (Posada-Pérez *et al.*, 2003; Roels *et al.*, 2005; López *et al.*, 2010; Basail *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo se realizó con el objetivo de multiplicar el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' mediante el uso de Sistemas de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas de plátano vianda cv. 'INIVITPV-2011' (*Musa AAB*) cultivadas *in vitro*, en fase de multiplicación con tres subcultivos en medio de cultivo semisólido. Estas se establecieron a partir de plantas donantes del banco de germoplasma de plátanos y bananos del INIVIT.

En estos experimentos se utilizó el medio de cultivo de multiplicación propuesto por López *et al.* (2010) compuesto por el 100% de las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) 2.25 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 0.18 mg l⁻¹ de ácido indolacético (AIA), 10.0 mg l⁻¹ de ácido ascórbico y 30.0 g l⁻¹ de sacarosa.

Los SIT se conformaron por dos frascos Nalgene® de 10.0 litros de capacidad, uno para colocar los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo. Se determinó el efecto del tiempo y la frecuencia de inmersión, el tiempo y duración del subcultivo y la densidad de inoculación en la multiplicación *in vitro* de este cultivar.

Se emplearon tres tratamientos (10, 20 (control) y 30 minutos) para determinar el efecto del tiempo de inmersión de los explantes en el medio de cultivo. El volumen de medio de cultivo fue de 40 ml por explante. Se realizó una inmersión cada seis horas, se emplearon 40 explantes por frasco de cultivo y tres repeticiones por tratamiento. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo.

Seguidamente, con el objetivo de evaluar el efecto de la frecuencia de inmersión se probaron tres variantes: una inmersión cada tres, seis (control) y ocho horas por día, con el tiempo de inmersión seleccionado del experimento anterior. Se emplearon 40 explantes por frasco de cultivo con 40 ml de medio de cultivo por explante y tres repeticiones por tratamiento. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo.

Para determinar el efecto del volumen de medio de cultivo por explante se utilizaron cuatro tratamientos (20, 40 (control), 60 y 80 ml/explante). Se utilizó el mejor tiempo y frecuencia

de inmersión obtenidos como resultado de las variables evaluadas en los experimentos anteriores. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo y se emplearon 40 explantes por frasco de cultivo y tres repeticiones por tratamiento.

Posteriormente, se seleccionó el tiempo de subcultivo, para ello los explantes fueron subcultivados y evaluados a los 15, 18, 21 (control) y 25 días de cultivo. El tiempo de inmersión y el volumen de medio de cultivo coincidieron con los mejores resultados del experimento anterior. Se emplearon 40 explantes por frasco de cultivo y tres repeticiones por tratamiento.

Finalmente, se evaluaron cuatro densidades de inoculación de los explantes (20, 40 (control), 60 y 80 explantes/frasco de cultivo). El tiempo de inmersión, el volumen de medio de cultivo y el tiempo de subcultivo fueron los seleccionados en los experimentos anteriores.

En todos los casos 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 la altura del explante (cm) que se midió con el auxilio de una regla graduada desde la base del pseudotallo hasta la inserción de la primera hoja. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

El coeficiente de multiplicación se calculó como: $CM = \text{Número de explantes obtenidos en el frasco de cultivo a los 21 días} / \text{Número de explantes adicionados al frasco de cultivo}$.

Todos los tratamientos fueron colocados en cámara de crecimiento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de $62\text{-}67 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperíodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

Los datos fueron analizados y se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas. La comparación múltiple de medias se realizó según la prueba de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C.

RESULTADOS

El tiempo de inmersión influyó de forma significativa en las variables evaluadas. Con 10 minutos de inmersión se alcanzaron los mejores resultados con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Tabla 1). Al utilizar una inmersión cada tres horas con

una duración de 10 minutos se obtuvieron los máximos valores para las variables evaluadas sin la presencia de brotes hiperhidratados (Tabla 2).

El volumen de medio de cultivo tuvo influencia sobre todas las variables evaluadas. Los mayores valores se alcanzaron cuando se empleó una relación de 60 ml de medio de cultivo por explante (Tabla 3).

A partir de los 18 días de realizado el subcultivo se obtuvieron los mayores valores del coeficiente de multiplicación, diámetro del pseudotallo, número de hojas activas y altura

del explante sin diferencias significativas entre los tratamientos. Se seleccionó el tiempo de subcultivo de 18 días, ya que se pudo obtener un mayor número de explantes en un menor tiempo y también el material vegetal está menos expuesto a riesgo de contaminación microbiana (Tabla 4).

La densidad de explantes por frasco también influyó en las variables evaluadas, los mejores resultados se obtuvieron con 60 y 80 explantes por frasco de cultivo de 10.0 litros de capacidad sin diferencias significativas entre estos tratamientos para las variables coeficiente de multiplicación, diámetro del pseudotallo y número

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal después de 21 días de cultivo.

Tiempo de inmersión (min)	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. Hojas Activas	Altura (cm)
10	3.10 a	0.46 a	2.65 b	2.26 a	2.76 a
20	2.40 c	0.12 c	3.27 a	1.08 b	1.45 c
30	2.25 b	0.24 b	2.01 c	1.12 b	2.14 b
ES ±	0.12 *	0.01 *	0.09 *	0.14*	0.10 *
CV (%)	8.86	10.40	11.24	12.56	13.36

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

Tabla 2. Efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal después de 21 días de cultivo.

Frecuencias de inmersión	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. Hojas Activas	Altura (cm)
3 horas	5.90 a	0.62 a	2.14 c	3.54 a	3.65 a
6 horas	4.90 c	0.38 c	3.09 a	2.22 c	2.43 c
8 horas	5.15 b	0.51 b	2.30 b	2.86 b	2.99 b
ES ±	0.23*	0.15 *	0.12 *	0.16*	0.13 *
CV (%)	17.65	12.24	11.34	11.89	11.37

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

Tabla 3. Efecto del volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal después de 21 días de cultivo.

Vol. (ml/explante)	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. Hojas Activas	Altura (cm)
20	4.11 d	0.63 c	2.25 c	2.75 b	2.52 b
40	5.22 b	0.59 c	2.75 b	2.99 b	2.78 b
60	7.58 a	0.95 a	2.12 c	3.37 a	2.99 a
80	6.01 c	0.75 b	3.01 a	2.85 b	2.43 b
ES ±	0.29*	0.37 *	0.18 *	0.13*	0.14 *
CV (%)	10.45	11.26	12.96	12.96	12.10

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

Tabla 4. Efecto del tiempo de subcultivo sobre la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal después de 21 días de cultivo.

Tiempo de subcultivo (días)	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. Hojas Activas	Altura (cm)
15	5.16 b	0.84 b	2.50 a	2.99 b	1.18 b
18	8.15 a	0.99 a	2.16 b	3.03 a	1.46 a
21	8.04 a	0.97 a	2.60 a	3.01 a	1.42 a
25	8.12 a	0.97 a	2.62 a	3.00 a	1.43 a
ES ±	0.29*	0.03 *	0.10 *	0.13 *	0.06 *
CV (%)	10.45	15.49	12.84	14.06	11.89

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

Tabla 5. Efecto de diferentes densidades de inoculación sobre la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) en el Sistema de Inmersión Temporal después de 21 días de

Densidad de explantes (No. de exp/ml)	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. Hojas Activas	Altura (cm)
20	4.18 c	0.54 b	2.50 a	2.99 a	1.42 b
40	6.71 b	0.61 b	2.60 a	3.03 a	1.46 b
60	8.45 a	0.99 a	2.06 b	2.98 a	1.98 a
80	8.22 a	0.97 a	2.62 a	3.00 a	1.43 b
ES ±	0.35*	0.05 *	0.11 *	0.15*	0.08 *
CV (%)	13.39	17.52	13.07	14.58	12.37

de hojas activas (Tabla 5). A partir de los resultados se seleccionó la densidad de 60 explantes por frasco de cultivo teniendo en cuenta que los explantes tenían menor grado de oxidación y mayor altura.

Los experimentos desarrollados permitieron seleccionar un tiempo y frecuencia de inmersión, tiempo y duración del subcultivo y densidad de inoculación que incrementaron el coeficiente de multiplicación en el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) de 3.5 en medio de cultivo semisólido a 8.45 en Sistemas de Inmersión Temporal. Además, se mejoraron las características de las plantas tales como diámetro del pseudotallo, número de hojas activas y grado de oxidación lo cual permitirá propagar este cultivar y disponer de mayor número de plantas para fomentar plantaciones en el país.

REFERENCIAS

Basail, M, Medero V, Otero E, Torres M, López J, Cabrera M, Santos A, Rayas A, Bauta M, Beovides Y (2012) Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación *in vitro* del

cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB). Biotecnología Vegetal 12 (1): 53-57

López J, Montano N, Reynaldo D, Medero V, Basail M, Rayas A (2010) Micropropagación de clones de banano cv. 'FHIA-25' en Biorreactor de inmersión temporal. Biotecnología Vegetal 3(5): 101-107

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497

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

Posada-Pérez L, Gómez-Kosky R, Reyes M, Álvarez L (2003) Empleo de los sistemas de inmersión temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. Biotecnología Vegetal 3(1): 6-8

Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal M, Rodríguez R, Debergh P (2005) Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by Temporary immersion System. Plant Cell Tissue and Organ Culture 82: 57-66

Recibido: 17-2-2015

Aceptado: 2-6-2015