

Influencia de reguladores e inhibidores del crecimiento en la multiplicación de brotes axilares del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal

Milagros Basail^{1*}, Rafael G. Kosky², Víctor Medero¹, Eneida Otero¹, Marlenys Torres¹, Manuel Cabrera¹, Jorge López¹, Magaly García¹, Arletys Santos¹, Aymé Rayas¹, José de la C. Ventura¹, Maricel Bauta¹, Miguel Álvarez¹, Eriker Páz¹, Yoel Beovidez¹, Julia Albert¹, Alberto Espinosa¹ y Jesús García¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6, Santo Domingo, CP 53 000, Villa Clara, Cuba.

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

RESUMEN

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) con el objetivo de determinar el medio de cultivo para la multiplicación en sistema de inmersión temporal (SIT) del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB). Se estudiaron diferentes combinaciones de reguladores y un inhibidor del crecimiento: 6-Bencilaminopurina (6-BAP), Ácido indolacético (AIA) y el Paclobutrazol (PBZ). Los resultados permitieron la multiplicación del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en el sistema de inmersión temporal con un medio de cultivo compuesto por las sales Murashige y Skoog (MS), 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP; 0.65 mg.l⁻¹ de AIA; 10.0 mg.l⁻¹ de ácido ascórbico y 1.0 mg.l⁻¹ de paclobutrazol. Se logró disminuir el crecimiento innecesario de los brotes en la fase de multiplicación y se alcanzó un mayor número de brotes obtenidos por explantes inoculados sin la presencia de multiyemas ni síntomas de hiperhidricidad. Estos resultados utilizando el Sistema de Inmersión Temporal permitieron incrementar el número de brotes axilares del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) así como la calidad de las plantas.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, micropropagación, paclobutrazol

ABSTRACT

This work was carried out at the Plant Biotechnology Laboratory from the Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) in order to determine the culture medium for the multiplication of hybrid 'FHIA-21' (AAAB) in Temporary Immersion Systems. Different combinations of growth regulators and growth inhibitors (6-BAP, IAA and PBZ) were studied. Results permitted to determinate the effect of 6-benzil-amino-purine (6-BAP), Indol Acetic Acid (AIA) and Paclobutrazol (PBZ) for multiplication of hybrid 'FHIA-21' (AAAB) in the Temporary Immersion System, which involved supplemented MS salts with 2.0 mg.l⁻¹ 6-BAP; 0.65 mg.l⁻¹ IAA and 10.0 mg.l⁻¹ ascorbic acid; as well as, 1.0 mg.l⁻¹ paclobutrazol. A decrease of unnecessary growing of shoots and leaves from sprouts in the multiplication phase and a greater sprout number per inoculated explant without multibuds and hyperhydricity were achieved. The Temporary Immersion System allowed to increase the number of axillary sprouts by micropropagation of hybrid 'FHIA-21' (AAAB) and a higher quality *of in vitro* plants.

Key words: multiplication coefficient, micropropagation, paclobutrazol

INTRODUCCIÓN

El cultivo del plátano (*Musa spp.*) es una importante fuente de alimento para una gran parte de la población mundial, localizada principalmente en países subdesarrollados de Asia, África, América Central y del Sur, la producción anual se estimó en 32.7 millones de toneladas y los rendimientos en 63.04 t.ha⁻¹ (FAO, 2004).

Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos, la micropropagación es una alternativa desarrollada para la producción a gran escala de plantas, que ha sido utilizada con éxito desde los años 60 del siglo pasado. La principal ventaja de esta técnica se basa

en la multiplicación rápida del material vegetal clonal libre de enfermedades, fisiológicamente uniforme y con un desarrollo normal. Estas características han servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante la selección, mutación, programas de mejora y manipulación genética (Cañal, 1999). En general la micropropagación de plantas presenta algunas desventajas como son: bajos coeficientes de multiplicación, alto costo por mano de obra y la escasa posibilidad de automatización que brinda el proceso (Kitto, 1997).

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) además de solucionar las dificultades de los cultivos en

medios de cultivo líquidos estáticos, abren la posibilidad de semiautomatizar algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard *et al.*, 1993; Ettienne y Berthouly, 2002), permiten mayor facilidad de escalado y aumentan la eficiencia biológica y productiva del material vegetal propagado (Escalona *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 1999; Castro, 2001). Al mismo tiempo la morfología y respuesta fisiológica de los cultivos en los sistemas de inmersión temporal son muy semejantes a los que presentan las plantas en condiciones *ex vitro*, lo que permite una mayor tasa de supervivencia (Teisson y Alvard, 1994; Escalona *et al.*, 1999).

De esta forma, el cultivo en inmersión temporal puede constituir una vía alternativa de micropropagación a corto plazo, mientras, a largo plazo se venzan obstáculos biológicos que permitan la obtención eficiente de plantas y embriones somáticos en biorreactores (Escalona *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), Ácido indolacético (AIA) y Paclobutrazol (PBZ) en la multiplicación de brotes axilares de 'FHIA-21' (AAAB) en Sistemas de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del experimento se utilizó el cv. híbrido de plátano vianda 'FHIA-21' (AAAB), procedente del banco de germoplasma de plátanos y bananos del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Se utilizó el Sistema de Inmersión Temporal compuesto por dos frascos de cultivo de 10 litros de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo.

Para la determinación del medio de cultivo se utilizaron combinaciones de reguladores del crecimiento como 6-bencilaminopurina (6-BAP) (2.0 mg.l⁻¹, 3.0 mg.l⁻¹ y 4.0 mg.l⁻¹) y Ácido indolacético (AIA) (0.0 mg.l⁻¹, 0.65 mg.l⁻¹ y 1.30 mg.l⁻¹) adicionado al medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), 30.0 g.l⁻¹ de sacarosa; 10.0 mg.l⁻¹ de ácido ascórbico y 0.5 mg.l⁻¹ de paclobutrazol (PBZ).

Además, se estudiaron tres concentraciones de paclobutrazol (0.0 mg.l⁻¹, 0.5 mg.l⁻¹ (control), 1.0 mg.l⁻¹ y 1.5 mg.l⁻¹) junto a 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.65 mg.l⁻¹ de AIA.

En ambos experimentos se utilizó un tiempo de inmersión de diez minutos con una frecuencia de 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 brote (cm). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

El coeficiente de multiplicación se calculó de la siguiente forma:

$$CM \text{ P\%} = \frac{\text{Número de brotes obtenidos del frasco de cultivo}}{\text{Número de brotes adicionados al frasco de cultivo}}$$

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

Con los criterios de estadística descriptiva se realizaron las figuras que expresan los resultados procesados. La comparación múltiple de medias se realizó según Tukey (Lerch, 1977). Se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C de la Universidad de Michigan (Bricker, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar la combinación de los reguladores del crecimiento sobre la variable coeficiente de multiplicación, los resultados muestran que la media más alta para el coeficiente de multiplicación (11.96) se obtuvo con el tratamiento dos, con diferencias significativas con el resto (Figura 1).

Este tratamiento dos (2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.65 mg.l⁻¹ de AIA) mostró la mejor respuesta en cuanto a las variables estudiadas para el diámetro del pseudotallo, grado de oxidación, número de hojas activas y altura del brote con diferencias significativas sobre los restantes. El grado de oxidación tuvo diferencias significativas con los tratamientos cinco (3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.65 mg.l⁻¹ de AIA) y ocho (4.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.65 mg.l⁻¹ de AIA) (Tabla 1).

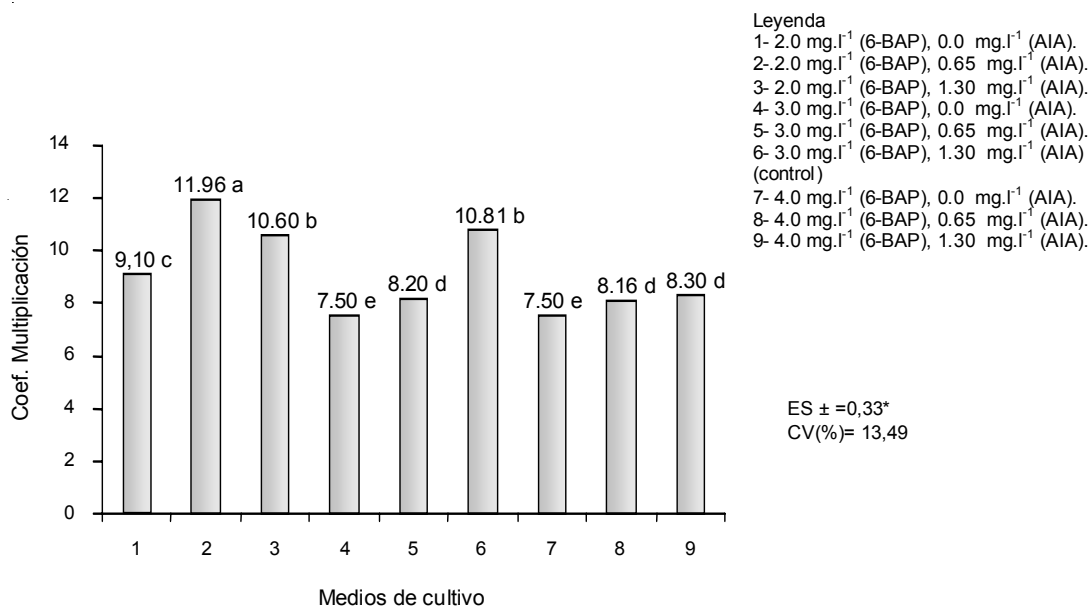
A los 21 días de cultivo no se presentaron multiyemas en los brotes ni hiperhidricidad en los mismos.

Ventura *et al.* (2002) en el cultivar híbrido 'FHIA-25' (AAA) obtuvieron un coeficiente de multiplicación de 12.61 con un tiempo y frecuencia de inmersión de diez minutos cada tres horas con el empleo de 2.10 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 1.30 mg.l⁻¹ de AIA.

Por su parte, De Fera *et al.* (2005) al utilizar 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 1.0 mg.l⁻¹ de AIA refirieron un coeficiente de multiplicación de 6.16 en el cultivar híbrido 'FHIA-21' con la adición de 60 explantes y 50 ml de medio de cultivo por explante.

Colmenares y Jiménez (2003) para bananos del cv. 'Grande naine' (AAA) del subgrupo Cavendish multiplicados en 2.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP, señalaron un índice de multiplicación de 2.1 para el medio de cultivo semisólido y 5.2 en Sistema de Inmersión Temporal.

Dottin (2000) al emplear 1.0 y 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 1.2 mg.l⁻¹ de AIA obtuvo los máximos valores en el cultivo de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) en sistemas de inmersión temporal.



Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren para p<0,05 según prueba de Tukey.

Figura 1. Efecto de las combinaciones de los reguladores del crecimiento (6-BAP y AIA) sobre el coeficiente de multiplicación en el híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal.

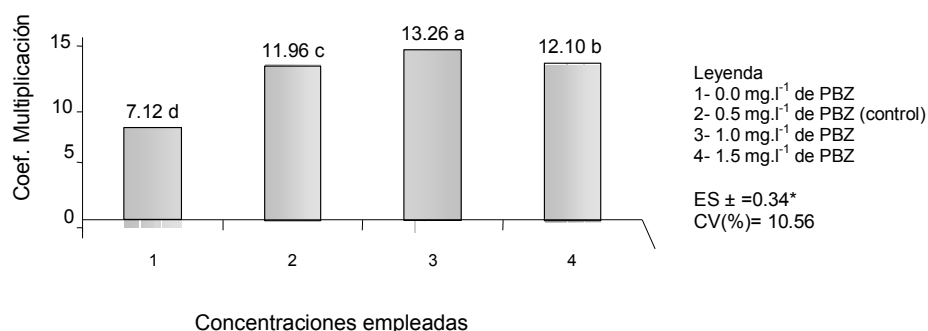
Tabla 1. Influencia de la combinación de dos reguladores del crecimiento (6-BAP y AIA) sobre la multiplicación del híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal.

Ttos	6-BAP (mg.l ⁻¹)	AIA (mg.l ⁻¹)	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	Hojas Activas	Altura (cm)
1	2	0.0	0.54 cd	3.80 ab	3.95 bc	2.37 de
2	2	0.65	0.84 a	2.99 b	4.40 a	3.30 a
3	2	1.30	0.73 b	3.95 ab	3.95 bc	3.00 bc
4	3	0.0	0.47 ef	3.45 ab	3.55 cd	2.30 de
5	3	0.65	0.71 bc	4.05 a	3.50 cd	2.76 c
6	3	1.30	0.69 bc	3.12 ab	4.05 bc	2.60 cd
7	4	0.0	0.46 ef	4.00 ab	3.30 d	2.62 cd
8	4	0.65	0.63 cd	4.05 a	3.70 bcd	2.21 e
9	4	1.30	0.56 cd	3.90 ab	3.85 bc	2.31 de
	ES ±		0.03 *	0.13 *	0.10 *	0.07 *
	CV (%)		16.32	15.47	11.83	13.01

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

Al evaluar el efecto del paclobutrazol sobre la formación de brotes axilares se observó una mayor uniformidad en la brotación con la aplicación de este inhibidor del crecimiento (1.0 mg.l⁻¹ de PBZ) con un coeficiente de multiplicación (13.26) con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos. El paclobutrazol promovió la formación de agregados de brotes pequeños muy compactos con poco desarrollo de las hojas, de esta forma se evitó el crecimiento innecesario durante el estado de proliferación (Figura 2).

La combinación del paclobutrazol (1.0 mg.l⁻¹) con el cultivo en sistema de inmersión temporal produjo un marcado incremento en el diámetro de pseudotallo, no siendo así con el número de hojas activas y altura del brote donde se obtuvieron los menores valores numéricos pero con diferencias significativas respecto a las concentraciones de 0.0 y 0.5 mg.l⁻¹ de PBZ, además al evaluar el grado de oxidación se obtuvo el menor valor respecto a los demás tratamientos (Tabla 2).



Medias con letras desiguales sobre las barras difieren para $p < 0.05$ según prueba de Tukey.

Figura 2. Efecto del paclobutrazol sobre el coeficiente de multiplicación en el cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) a los 21 días de cultivo en Sistema de Inmersión Temporal.

Tabla 2. Efecto del paclobutrazol (PBZ) en la multiplicación del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal.

Concentraciones PBZ (mg.l ⁻¹)	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	Hojas Activas	Altura (cm)
0.0	0.45 c	2.95 a	5.70 a	5.10 a
0.5	0.83 b	2.99 a	4.40 b	3.30 b
1.0	0.96 a	2.60 b	3.01 c	1.42 c
1.5	0.85 b	3.01 a	3.04 c	2.17 c
ES ±	0.03 *	0.11 *	0.10 *	0.06 *
CV (%)	17.15	15.05	13.00	13.14

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

El uso del paclobutrazol en los Sistemas de Inmersión Temporal, posibilitó reducir el tamaño de los brotes, lo que permitió la producción de un mayor número de brotes por frasco sin la aparición de multiyemas ni de hiperhidricidad (Figura 3).

Daquinta *et al.* (2001) utilizaron una concentración de 2.0 mg.l⁻¹ de paclobutrazol combinado con el 6-BAP (4.0 mg.l⁻¹) donde obtuvieron un coeficiente de multiplicación (7.30) en brotes del banano 'FHIA-18' (AAAB).

Albany *et al.* (2005) trabajando con Sistemas de Inmersión Temporal de 1.0 litros de capacidad observaron una respuesta similar en cuanto al desarrollo foliar del cultivar de banano 'Grande naine' y recomendaron el empleo de retardadores del crecimiento como el paclobutrazol y el ancimídol para dar solución a está limitante.

En otros cultivos Daquinta *et al.* (1999), establecieron el uso del PBZ (0.12 mg.l⁻¹) en la fase de multiplicación en Sistema de Inmersión Temporal

para estimular la formación de agregados de brotes compactos en algunas bromelias (*Aechmea fasciata*, *Aechmea kertes*, *Aechmea blumenaoil*, *Neoregelia carolina*, *Cryptanthus bromelioides* y *Ananas nanus*); alcanzando un alto número de plantas uniformes y competentes para la adaptación a condiciones *ex vitro*.

Autores como Ziv *et al.* (1998) y Escalona *et al.* (1999), trabajando con otros cultivos han aplicado retardadores del crecimiento para reducir o eliminar estos problemas.

Según Capote *et al.* (2005) al utilizar una concentración de 1.0 mg.l⁻¹ de paclobutrazol y una frecuencia de tres horas obtuvieron los mejores resultados en cuanto al coeficiente de multiplicación en el híbrido de *Vriesea* (*Bromelia* ornamental).

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. Brotes *in vitro* del cv. híbrido 'FHIA-21' (AAB) cultivados con 2.0 de 6-BAP, 0.65 mg.l⁻¹ de AIA y 1.0 mg.l⁻¹ de paclobutrazol a los 21 días de cultivo en Sistema de Inmersión Temporal.

CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados en el trabajo permitieron demostrar que es posible multiplicar el cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal con el empleo del medio de cultivo basal MS, 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP; 0.65 mg.l⁻¹ de 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) lo que garantizó la mejor respuesta de los brotes en cuanto al coeficiente de multiplicación y sin síntomas de hiperhidricidad ni presencia de multiyemas.

REFERENCIAS

- Albany, N, Vilchez J, García L, Jiménez E (2005) Comparative study of morphological parameters of 'Grand Nain' banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 83 (3): 357-361
- Alvard, D, Cote F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquids medium culture for banana micropropagation. Effects of Temporary Immersion of explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 32: 55-60
- Cañal, M (1999) Fisiología del cultivo *in vitro*. En: *Biotecnología Vegetal: Libro de reportes cortos del 5^o Coloquio Internacional de Biotecnología vegetal*, pp. 14-22, IBP, Santa Clara
- Capote, I, Benegas R, Daquinta M, Escalona M (2005) Efecto del paclobutrazol y la frecuencia de inmersión en la morfogénesis de *Vriesea* propagada en Biorreactores de Inmersión Temporal. VI Taller Internacional sobre Recursos Fitogénéticos FITOGEN'05, pp.126-128. Sancti Spiritus
- Castro, D (2001) Propagación mixotrófica de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en biorreactores de Inmersión Temporal. Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplantas. Cuba
- Colmenares, M, Jiménez C (2003) Multiplicación *in vitro* *Musa* spp. mediante el Sistema de Inmersión Temporal. pp. 468-477
- Daquinta, M, Espinosa P, Escalona M, Rodríguez R y Guerra M (1999) Bromeliad. Micropropagation in a Temporary Immersion System. *Brasilian Journal of Plant Physiology*. Resumos de VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Suplemento. 11: 177-178
- Daquinta, M, Lezcano Y, Escalona M, Santos R (2001) Multiplicación *in vitro* del banano 'FHIA 18' con el empleo de paclobutrazol. *INFOMUSA* 10 (2): 22-24
- De Feria, M, Jiménez E, Chávez M (2005) Efecto de la frecuencia inmersión y la disponibilidad de medio de cultivo en la multiplicación del cultivar híbrido 'FHIA-21' en Sistema de Inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* 5(1): 9-15
- Dottin, M (2000) Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schoott). Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas. pp. 21-24. IBP. Santa Clara
- Escalona, M, González B, Lorenzo J, Daquinta M, Espinosa P, Fundora Z, Espinosa D, Borroto C (1997) Propagación *in vitro* de la piña en sistemas de inmersión temporal. *BioVeg'97. Técnicas de Avanzadas aplicadas a la propagación masiva de plantas*. Ciego de Ávila, Cuba. Libro de resúmenes. 157p.
- Escalona, M, Cid M, Lezcano Y, Capote I, Yáñez E, González J (1999) Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en biorreactores de inmersión temporal. Efecto de la frecuencia de inmersión y el paclobutrazol. *BioVeg'99*. Ciego de Ávila, Cuba. Libro de resúmenes. 28p.
- Ettienne, H, Berthouly M (2002) Temporary Immersion System in plan micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54:197-200
- FAO (2004). Boletín trimestral FAO de Estadísticas. Roma
- García, M, Meneses S, Estrada E, Álvarez E (1999) Uso del paclobutrazol para la regulación del crecimiento y aclimatización de vitropiantas de ñame (*Dioscorea alata* L.). *BioVeg '99*. Ciego de Ávila, Cuba. Libro de resúmenes. 32p.
- Jiménez, E, Pérez N, De Feria M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quila E, Pérez JC (1999) Improved production of potato microtubers using a Temporary Immersion System. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59:19-23
- Kitto, JM (1997) Commercial Micropropagation *HorScience*. 32(6):1-3
- Lerch, G (1977) La experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Ed. Científica y Técnica. La Habana.
- 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

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

Teisson C, Alvard D (1994) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Immersion. En: Proceedings of the 8th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, pp. 105-110. Florence, Italy, 12-17 June

Ventura, J, Medero V, López J, García M, Rodríguez S, García J, Reynaldo D (1998) Manejo de los explantes en Inmersión Temporal, clon de Plátano 'FHIA-18'. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacios de convenciones de La Habana. FAO. La Habana.

Ventura, J, Medero V, López J, García M, Rodríguez S, García J, Reynaldo D, Rayas A, Ramírez T, Hernández M, Armarío D, González L, Simó J, González J, Triana O, Ortega A, Portieles J, Martínez M; Torres M, Gálvez J, Basail M, Santos A (2002) Tecnología para la producción de plátanos y bananos. Memorias en CD. Evento de AGRONAT. Universidad de Cienfuegos. Cienfuegos.

Ziv, M, Ronen G, Raviv M (1998) Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large scale micropropagation of plants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 17:101-110