

Multiplicación *in vitro* de 'FHIA-25' (*Musa spp.*, AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal

Milagros Basail Pérez*, Víctor Medero Vega, Eneida Otero Gálvez, Marlenys Torres Delgado, Manuel Cabrera Jova, Jorge López Torres, Arletys Santos Pino, Aymé Rayas Cabrera, Maricel Bauta Toledo, Eriker Páz Chávez, Yoel Beovidez García, Alexis Ortega Ortiz, José Enrique Pérez Martínez
*Autor para correspondencia.

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

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, como el uso del Sistema de Inmersión Temporal (SIT). El presente trabajo fue desarrollado con el objetivo de multiplicar en SIT cultivar híbrido 'FHIA-25' (*Musa spp.*, AAB). Se determinó 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. Se comprobó que estos dos factores tuvieron influencia sobre las variables evaluadas. Se seleccionaron 40 ml de volumen de medio de cultivo por explante y una densidad de 80 explantes/frasco para multiplicar este cultivar en SIT. Estos resultados permitieron incrementar la producción de plantas *in vitro* de mayor calidad para la fase de enraizamiento.

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

ABSTRACT

Necessity to produce high quality planting material has required searching new alternatives to increase the efficiency of *in vitro* propagation methods and their automation, as in Temporary Immersion Systems (TIS). This work was aimed to multiply the hybrid 'FHIA-25' (*Musa spp.* AAB) in TIS. The effect of different culture medium volumes per explant and densities of planting materials per culture flask at the same immersion frequency was determined. These two factors showed influence on the evaluated variables. A volume of 40 ml of culture medium per explant and densities of 80 explants per flask were selected to multiply this cultivar in TIS. These results permitted to increase *in vitro* production of high-quality plants for rooting stage.

Key words: multiplication coefficient, culture flasks, liquid culture medium

INTRODUCCIÓN

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, como el uso del Sistema de Inmersión Temporal. Simontol y Robacker (1991) y Aitcken-Christie *et al.* (1995), desarrollaron investigaciones sobre la automatización en la propagación de plantas, que incluyen el diseño de nuevos sistemas para la micropropagación, ya que reducen el costo por explantes, permiten una mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen y un mejor comportamiento de las plantas *ex vitro* por mayor metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro*.

in vitro por mayor metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro*.

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), permiten mayor facilidad de escalado y aumentan la eficiencia biológica y productiva del material vegetal propagado (Jiménez *et al.*, 1999; Castro, 2001). Al mismo tiempo la morfología y el comportamiento fisiológico de los cultivos en los SIT son muy semejantes a los que presentan las plantas en condiciones *ex vitro*, lo que permite una mayor tasa de supervivencia (Escalona *et al.*, 1999).

En varios cultivos se ha demostrado que la inmersión temporal de los explantes en el medio de cultivo estimula la multiplicación de los brotes (Escalona *et al.*, 2003). Los SIT se han empleado en la propagación de diferentes cultivares de *Musa* (Alvard *et al.*, 1993; Daquinta *et al.*, 2000; Matsumoto y Brandao, 2002; Escalona *et al.*, 2003), sin embargo, no se encontraron referencias de su uso para la propagación del cultivar híbrido de banano 'FHIA-25'.

El cultivar 'FHIA-25' (*Musa acuminata x balbisiana*, grupo AAB), obtenido por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), es un banano de cocción, cuya planta es de bajo porte y de crecimiento vigoroso que produce grandes racimos de frutas. Es altamente resistente a la enfermedad Sigatoka hoja, que es la más destructiva y costosa de la mayoría de los bananos y plátanos a nivel mundial. Tiene excelentes cualidades de cocción como fruta verde. Esta combinación de las características de las plantas y de la fruta lo convierte en un candidato para el cultivo como un banano de cocción verde en las zonas donde la Sigatoka negra ha reducido drásticamente el rendimiento de variedades de plátanos y bananos que tradicionalmente han sido cultivadas para la producción de fruta verde para cocción. Para su propagación se utilizan técnicas convencionales de reproducción asexual (Rowe, 1993). El empleo de técnicas de cultivo *in vitro*, específicamente los SIT, podría contribuir a su propagación masiva para que los productores dispongan de este valioso material vegetal.

Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo se realizó con el objetivo de multiplicar 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron plantas de banano cv. 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) cultivadas *in vitro*, en fase de multiplicación con tres subcultivos en medio de cultivo semisólido. Estas procedían del banco de germoplasma de plátanos y bananos del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT).

Los Sistemas de Inmersión Temporal estuvieron compuestos 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 (Escalona *et al.*, 1999).

Para multiplicar los brotes de 'FHIA-25' se determinó el efecto del volumen de medio de cultivo por explante y la densidad de inoculación en los SIT sobre el coeficiente de multiplicación y otras variables morfológicas.

Se consideró como explante un brote individual de aproximadamente 2 cm de altura y tres hojas abiertas, sin decapitar. Se inocularon 60 explantes por frasco de cultivo (SIT), los cuales fueron colocados primeramente en tubos de ensayos de 15 milímetros de diámetro donde se le adicionó un medio de cultivo semisólido de crecimiento bacteriológico donde permanecieron por un tiempo de 72 horas para observar la presencia de microorganismos contaminantes.

Para determinar el efecto del volumen de medio de cultivo por explante se utilizaron cinco tratamientos (20, 30 (control), 40, 50 y 60 ml/explante). Como medio de cultivo basal se empleó el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) con 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 1.5 mg l⁻¹ de paclobutrazol (PBZ).

Además, se estudiaron cinco densidades de explantes (20, 40, 60 (control), 80 y 100 explantes/frasco de cultivo), utilizando el medio de cultivo antes mencionado con un volumen de 40 ml/explante.

En ambos experimentos se utilizó un tiempo de inmersión de diez minutos a una frecuencia de tres horas. Las evaluaciones se realizaron 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 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 de la siguiente forma:

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

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 $62\text{-}68\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y fotoperíodo 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 de la Universidad de Michigan (Guzmán y Castaño, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El volumen de medio de cultivo tuvo influencia sobre todas las variables evaluadas con la adición de 60 explantes por frasco de cultivo de 10 litros de volumen total. Los mayores valores en cuanto a las variables evaluadas se alcanzaron cuando se empleó una relación de 40 ml de medio de cultivo por explante sin diferencias significativas con el tratamiento de 50 ml por explantes excepto con el grado de oxidación donde se obtuvo el menor valor (Tabla 1).

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' (*Musa* spp., AAB).

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 referidos 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.

Igualmente, Basail *et al.* (2003) demostraron que para el clon de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) 'CMC-40' un volumen de medio de cultivo de 40 ml por explante, en frascos de Sistema de Inmersión Temporal incrementó el coeficiente de multiplicación a 6.5 por cada explante inoculado.

La densidad de explantes por frasco también influyó en las variables evaluadas (Tabla 2). Cuando se utilizaron 80 explantes por frasco de 10 litros de capacidad, en cuanto al coeficiente de multiplicación y diámetro del pseudotallo no se obtuvieron diferencias significativas con 60 y 100 explantes/frasco de cultivo y sí con el resto de los demás tratamientos. En cuanto al grado de oxidación, número de hojas activas y altura del explante se obtuvieron los menores valores con 60, 80 y 100 explantes por frasco sin diferencias significativas entre ellos, pero sí con el resto. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó la densidad de 80 explantes por frasco de cultivo, pues hay una mayor asimilación de los nutrientes que componen el medio de cultivo y por tanto un mejor aprovechamiento de los frascos de cultivo Nalgene de 10 litros de capacidad (Figura 1).

Tabla 1. Efecto del volumen de medio de cultivo por explante sobre la multiplicación de brotes del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB), en Sistema de Inmersión Temporal, a los 21 días de cultivo.

Vol. de medio de cultivo/explante (ml)	Coef. multip.	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado oxidación	Número de hojas Activas	Altura (cm)
20	9.13 d	0.52 c	3.01 a	2.12 d	1.12 c
30	10.99 c	0.56 c	2.99 a	2.29 c	1.25 c
40	12.21 a	1.01 a	2.51 c	2.81 a	1.98 a
50	12.15 a	0.97 a	2.75 b	2.79 a	1.93 a
60	11.26 b	0.82 b	2.98 b	2.58 b	1.79 b
ES ±	0.25*	0.03 *	0.10*	0.13 *	0.06 *
CV (%)	12.36	16.14	13.55	15.54	12.10

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

Tabla 2. Influencia de la densidad de explantes por frasco de cultivo del cultivar híbrido 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB), en Sistema de Inmersión Temporal, a los 21 días de cultivo.

Número de explantes/frasco de cultivo	Coefficiente multip.	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado oxidación	Número de hojas activas	Altura (cm)
20	12.14 b	0.68 c	3.06 a	3.49 a	2.52 a
40	12.27 b	0.71 c	2.95 a	3.54 a	2.43 a
60	13.60 a	0.98 a	2.59 b	3.05 b	2.14 b
80	13.82 a	1.01 a	2.50 b	2.98 b	2.08 b
100	13.73 a	0.96 a	2.53 b	2.99 b	2.10 b
ES ±	0.24*	0.09*	0.11*	0.06*	0.12*
CV (%)	12.75	16.21	14.10	12.01	15.34

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



Figura 1. Brotes del cultivar híbrido 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) a los 21 días de cultivo en Sistema de Inmersión Temporal, con un volumen de medio de cultivo de 40 ml por explante y una densidad de 80 explantes por frasco de cultivo.

En el cultivar 'Grande naine', con el empleo de sistemas de inmersión temporal de 1 litro de capacidad, Albany (2001) señaló que la variable que determinó un incremento en el coeficiente de multiplicación, masa fresca de los brotes, masa final y masa útil, es la densidad de inóculo, y alcanzaron los mejores resultados con la adición de 25 explantes/frasco de cultivo.

CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados en el trabajo permitieron demostrar que es posible multiplicar el cultivar híbrido 'FHIA-25' (*Musa* spp., Grupo AAB), en Sistema de Inmersión Temporal con el empleo de un volumen de medio de cultivo

de 40 ml/explante y una densidad de 80 explantes/frasco de cultivo logrando un mayor aprovechamiento de los medios de cultivos y de los frascos a utilizar.

REFERENCIAS

- Aitken-Christie, J, Davies E, Kubota C, Kosai T (1995) Automation in Plant Tissue Culture. General introduction overview: Automation and environment control in Plant Tissue Culture, pp.1-19. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht
- 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. UCLV. Santa Clara
- Alvard, D, Cote F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquids médium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. In: Plant Cell Tissue and Organ Culture 32: 55-60
- Basail, M, Mederos V, Martínez M, López J, Cabrera M, Santos A, Ventura J, García M, Rayas A, Pons C, Bauta M, Álvarez M, García J (2003) Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la micropropagación de la yuca en Sistema de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal 3(2): 93-96
- Castro, D (2001) Propagación mixotrófica de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maide 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
- Castro, D, González J (2002) *Eucalyptus (Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. Agricultura sostenible, Colombia 62 (1): 68-78
- Escalona M, Cejas I, González-Olmedo J, Capote I, Roels S, Cañal M J, Rodríguez R, Sandoval J, Debergh P (2003) Efecto de meta-topolina sobre la propagación del plátano utilizando un biorreactor de inmersión temporal. Infomusa 12 (2):28-29
- 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. p. 28
- Guzmán, O, Castaño J (2002) Reconocimiento de nemátodos fitopatógenos en plátanos 'Dominico hartón' (*Musa* AAB, Simmonds), 'Africa', 'FHIA 20' y 'FHIA 21' en Colombia. InfoMusa 11(2): 34-35
- Jiménez, E, Pérez N, de Feria M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quila E, Pérez J (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 19-23
- Kitto, J (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. p. 288
- Mtsumoto K, Brandao AKC (2002) Comparación de los sistemas de inmersión temporales y permanentes para el cultivo *in vitro* de los bananos. Infomusa 11(2): 36-37
- 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
- Rowe, Phillip Ray (2003) Cooking banana plant 'FHIA-25'. United States Patent. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (San Pedro Sula, HN). PP13874. [En línea]: <http://www.freepatentsonline.com/PP13874.html> . Consultado el 25 de marzo de 2008
- Simonton, W, Robacker C (1991) A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 17: 211-218
- Ziv, M (2005) Simple bioreactor for mass propagation of plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 277-285