

## Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB)

Milagros Basail Pérez\*, Víctor Medero Vega, Eneida Otero Gálvez, Marlenys Torres Delgado, Jorge López Torres, Manuel Cabrera Jova, Arletys Santos Pino, Aymé Rayas Cabrera, Maricel Bauta Toledo, Yoel Beovidez García. \*Autor para correspondencia

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

### RESUMEN

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) se han empleado para la multiplicación *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. y permiten obtener elevados coeficientes de multiplicación. El presente trabajo se realizó con el objetivo de multiplicar el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) en SIT. Se llevaron a cabo experimentos independientes y consecutivos donde se determinó el efecto del tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo, el tiempo de cultivo y el número de explantes por frasco sobre la multiplicación de este cultivar en SIT. Con un tiempo de inmersión de 10 minutos, frecuencia de inmersión cada 6 horas, 40 ml de medio de cultivo por explante, 90 explantes por frasco de cultivo y 18 días de cultivo se obtuvieron los mejores resultados. Se logró multiplicar el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) en SIT. El coeficiente de multiplicación y la calidad del material vegetal fueron elevados lo que permitirá su introducción en la producción en biofábricas.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, explantes, micropropagación

### ABSTRACT

Temporary Immersion Systems (TIS) had been used for *in vitro* multiplication of different cultivars of *Musa* spp. achieving high coefficients of multiplication. This investigation was carried out to focussed on the multiplication of the plantain 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) in (TIS). Independent and consecutive experiments were realized to determine the effect of immersion period, immersion frequency, culture medium volume, time of culture and number of explants per flask on the multiplication of this cultivar in TIS. The best results were obtained with immersions of 10 minutes every 6 hours as immersion frequency, 40 ml culture medium per explant, 90 explants per culture flask and 18 days of culture. Plantain cultivar 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) was multiplied in TIS. The multiplication coefficient and the quality of plant material were high allowing the scaling of them in the tissue culture commercial laboratories biofactories.

Key words: explants, micropropagation, multiplication coefficient

En Cuba los plátanos tipo vianda constituyen un cultivo estratégico de elevada prioridad dentro del programa alimentario nacional debido a su capacidad de producir todos los meses del año, su elevado potencial de rendimiento, arraigados hábitos de consumo y diversidad de usos. Por ello se requiere de elevar los volúmenes de producción e introducir nuevos cultivares con características agronómicas deseadas.

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) se han empleado para la multiplicación *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. (Posada-

Pérez *et al.*, 2003; De Feria *et al.*, 2005; Aragón *et al.*, 2006; Basail *et al.*, 2007; Basail *et al.*, 2011) y permiten obtener elevados coeficientes de multiplicación. Sin embargo, no todos muestran una respuesta similar y por tanto se deben ajustar las principales variables que influyen en el coeficiente de multiplicación y la calidad de las plantas.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) con el objetivo de multiplicar el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) en SIT.

Como material vegetal se utilizaron plantas de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*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).

Para los Sistema de Inmersión Temporal se utilizó el diseño de dos frascos descrito por Escalona *et al.* (1999), pero con el empleo de frascos de cultivo de 10 litros de capacidad (Nalgene®), uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo. Se empleó el medio de cultivo de multiplicación constituido por sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) con 2.25 mg l<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), 0.65 mg l<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), 30.0 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 10.0 mg l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico.

Se llevaron a cabo experimentos independientes y consecutivos donde se determinó el efecto del tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo, el tiempo de cultivo y el número de explantes por frasco sobre la multiplicación de este cultivar en SIT.

En el experimento para seleccionar el tiempo de inmersión (5.0, 10.0 y 15.0 minutos), el volumen de medio de cultivo en la fase de multiplicación fue de 2000 ml por SIT (40 ml por explante). La frecuencia de inmersión se ajustó a cuatro inmersiones por día (cada seis horas). Se emplearon 50 explantes por frasco de cultivo. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo.

Posteriormente, con el objetivo de determinar el efecto de la frecuencia de inmersión se empleó el tiempo de inmersión seleccionado en el experimento anterior e igual volumen de medio de cultivo por explante (40 ml) y número de explantes por frasco (50). Se estudiaron tres frecuencias de inmersión: ocho inmersiones al día (cada 3.0 h), cuatro inmersiones al día (cada 6.0 h) y tres inmersiones por día (cada 8.0 h). Las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo.

El efecto del volumen de medio de cultivo por explante se comprobó mediante cuatro tratamientos (20, 30, 40 y 50 ml/explante). Se utilizaron el tiempo y la frecuencia de inmersión seleccionados como resultado de los experimentos anteriores. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo.

Para determinar el tiempo de cultivo y seleccionar el momento del subcultivo se estudiaron cuatro tratamientos (15, 18, 21 y 25 días de cultivo). Para las variables tiempo y frecuencia de inmersión así como volumen de medio de cultivo por explante se utilizaron los mejores resultados obtenidos anteriormente.

Finalmente, se estudiaron cuatro densidades de inoculación (número de explantes por frasco) (30, 50, 70 y 90 explantes/frasco de cultivo). Se utilizó el medio de cultivo antes mencionado con un volumen de 40 ml/explante.

En todos los experimentos 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) 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.

Todos los frascos de cultivo fueron colocados en cámara de crecimiento a 27±2°C con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 62-68 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C de la Universidad de Michigan. La comparación múltiple de medias se realizó según Tukey (Lerch, 1977).

Después de 21 de cultivo se comprobó que el tiempo de inmersión de los explantes en el medio de cultivo influyó de forma significativa en todas las variables evaluadas. Con un tiempo de inmersión de 10 minutos se alcanzaron los mejores resultados para las variables evaluadas, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Tabla 1).

El coeficiente de multiplicación se calculó de la siguiente forma:  

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

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión en la multiplicación en SIT del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa*AAB).

Tiempo de inmersión (min)	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. hojas Activas	Altura (cm)
5	7.40 c	0.16 c	4.55 c	2.10 c	1.99 c
10	9.10 a	0.51 a	3.32 a	3.80 a	2.52 a
15	8.25 b	0.27 b	3.85 b	3.00 b	2.00 b
ES ±	0.30	0.02 *	0.11 *	0.16 *	0.10 *
CV (%)	10.90	12.58	13.00	18.00	15.18

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 en la multiplicación en SIT del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa*AAB).

Frecuencia de inmersión diaria	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. hojas Activas	Altura (cm)
3 horas	8.90 c	0.15 c	4.10 a	3.10 c	1.99 c
6 horas	10.90 a	0.71 a	3.15 c	4.05 a	3.01 a
8 horas	9.15 b	0.49 b	3.35 b	3.80 b	2.48 b
ES ±	0.31*	0.03 *	0.09 *	0.11*	0.12 *
CV (%)	10.99	15.32	12.34	17.34	16.17

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

Por otra parte, al utilizar una frecuencia de inmersión cada 6 horas y con 10 minutos de inmersión se obtuvieron los máximos valores para las variables evaluadas con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos (Tabla 2).

El volumen de medio de cultivo tuvo influencia sobre todas las variables evaluadas. Los mayores valores se alcanzaron al emplear una relación de 40 ml de medio de cultivo por explante sin diferencias significativas con el tratamiento de 50 ml por explantes excepto con la altura del explante (Tabla 3).

No se observaron diferencias significativas para las variables evaluadas, excepto para

el grado de oxidación con tiempos de cultivo entre 18 y 25 días. Se seleccionó el tiempo de 18 días de cultivo, ya que se puede obtener una mayor cantidad de explantes en un menor tiempo y el material vegetal está menos expuesto a riesgo de contaminación microbiana (Tabla 4).

El número de explantes por frasco también influyó en las variables evaluadas (Tabla 5). Teniendo en cuenta los resultados se seleccionó como densidad de inoculación 90 explantes por frasco de cultivo, pues hay un mejor aprovechamiento de los frascos de cultivo de 10 litros de capacidad (Figura 1).

Tabla 3. Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la multiplicación en SIT del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa*AAB).

Volumen (ml)	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. hojas Activas	Altura (cm)
20	11.13 c	0.72 b	3.30 a	2.98 b	1.50 b
30	12.60 b	0.70 b	3.10 a	3.01 b	1.86 b
40	14.99 a	0.97a	2.61 b	3.00 a	1.40 a
50	14.82 a	0.99 a	2.69 b	3.03 a	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 cada columna difieren para  $p < 0.05$  según prueba de Tukey.*

Tabla 4. Efecto del tiempo de cultivo de los explantes en la multiplicación en SIT del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa*AAB).

Tiempo de cultivo (días)	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. hojas Activas	Altura (cm)
15	12.01 b	0.84 b	2.50 a	2.99 b	1.98 b
18	14.92 a	0.99 a	2.36 b	3.03 a	1.46 a
21	16.61 a	0.97a	2.60 a	3.01 a	1.42a
25	14.75 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 (%)	13.09	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 del número de explantes por frasco en la multiplicación en SIT del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa*AAB).

No. explantes	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	No. hojas Activas	Altura (cm)
30	12.01 b	0.84 b	2.50 a	2.99 b	1.98 b
50	14.92 a	0.99 b	2.36 b	3.03 a	1.46 a
70	16.61 a	0.97a	2.60 a	3.01 a	1.42a
90	14.75 a	0.97 a	2.62 a	3.00 a	1.43 a
ES ±	0.35*	0.05 *	0.11 *	0.15*	0.08 *
CV (%)	13.39	17.52	13.07	14.58	12.37

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



Figura 1. Plantas *in vitro* del cultivar plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) obtenidas en Sistema de Inmersión Temporal después de 21 días de cultivo.

## CONCLUSIONES

Se logró multiplicar el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) en SIT. Con un tiempo de inmersión de 10 minutos, frecuencia de inmersión cada 6 horas, 40 ml de medio de cultivo por explante, 90 explantes por frasco de cultivo y 18 días de cultivo se obtuvieron los mejores resultados. El coeficiente de multiplicación y la calidad del material vegetal fueron elevados lo que permitirá su introducción en la producción en biofábricas.

## REFERENCIAS

Aragón, C E, Escalona Maritza, Capote Iris, Cejas Inaudis, Rodríguez R, Sandoval J, Roels Sophie, Debergh P, González-Olmedo J L (2006) Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las plántulas de plátano (CEMSA  $\frac{3}{4}$ ) micropropagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). Cultivos Tropicales 27(1): 39-44

Basail, Pérez M, Kosky RG, Medero Vega V, Otero Gálvez E, Torres Delgado M, Cabrera Jova M, López Torres J, García García M, Santos Pino A, Rayas Cabrera A, Ventura Martín JC, Bauta Toledo M, Álvarez Mesa M, Páz Chávez E, Beovidez García Y, Albert Llerena J, Ortega Ortiz A, Espinosa Cuéllar A, García Ruiz J (2007) 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. Biotecnología Vegetal 7(1): 53 - 56

Basail, Pérez Milagros, Victor 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 (2011) Multiplicación *in vitro* de 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal 11(1): 27 - 31

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

Escalona, M, M Cid, Y Lezcano I Capote, E Yáñez, J González (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.

Lerch, G (1977) La experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Ed. Científica y Técnica. La Habana, 288p.

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

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

Posada-Pérez, L, RG Kosky, M Reyes, L Álvarez (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