

EMPLEO DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA MICROPROPAGACIÓN DEL CULTIVAR DE PLÁTANO VIANDA "INIVITPV-2011" (AAB)

Milagros Basail Pérez^{1*}, Victor Medero Vega¹, Marlenys Torres Delgado¹, Jorge López Torres¹, Arletys Santos Pino¹, Aymé Rayas Cabrera¹, Maricel Bauta Toledo¹, Yoel Beovidez García¹, Alexi Ortega Ortiz¹.

¹Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53000, Villa Clara, Cuba.

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 43,4 millones de toneladas y los rendimientos en 73,28ton.ha (FAO, 2010).

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, pero sus principales desventajas son: bajos coeficientes de multiplicación, alto costo por mano de obra y la escasa posibilidad de automatización que brinda el proceso (Kitto, 1997).

En los últimos tiempos se han desarrollado 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 (Aitcken-Christie *et al.*, 1995).

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

Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo se realizó con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación en el cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB) utilizando el Sistema de Inmersión Temporal.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivos de Tejidos de plantas del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT); ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

Material vegetal.

Como material vegetal se utilizaron plantas de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB) (*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).

Efecto del tiempo y frecuencia de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal

Efecto del tiempo de inmersión.

Para estudiar el tiempo de inmersión en la fase de multiplicación se estudiaron tres tratamientos (10, 20 (control) y 30 minutos). En este experimento se utilizó el medio de cultivo de multiplicación MS suplementado 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP; 3,5 mg.L⁻¹ de AIA; 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa; 10,0 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico. La frecuencia de inmersión fue de cuatro

inmersiones por día (cada seis horas). Las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo y se emplearon 40 explantes por frasco de cultivo y tres repeticiones por tratamiento

Efecto de la frecuencia de inmersión.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la frecuencia de inmersión en la fase de multiplicación se estudiaron tres frecuencias de inmersión, cada 3.0, 6.0 (control) y 8.0 horas por día, con el mejor tiempo de inmersión obtenido como resultado en las variables en el experimento anterior (10 minutos de inmersión).

Determinación del volumen de medio de cultivo en el Sistema de Inmersión Temporal.

Para determinar el efecto del volumen de medio de cultivo por explante se utilizaron tres tratamientos (20, 40 (control) y 60 ml/explante). Se utilizó el mejor tiempo y frecuencia de inmersión obtenido como resultado para las variables evaluadas en los experimentos anteriores.

Determinación del momento de subcultivo en el Sistema de Inmersión Temporal.

Se constituyeron cuatro tratamientos: 15; 18; 21 (control) y 25 días de cultivo. Se emplearon las mismas condiciones de los experimentos anteriores así como el mejor volumen de medio de cultivo obtenido.

Determinación de la densidad de explantes por frasco.

A partir de los resultados obtenidos en el Sistema de Inmersión Temporal con condiciones predeterminadas por las experiencias en el manejo de los mismos, se estudió la densidad de inóculo con el objetivo de mejorar las condiciones de cultivo, así como la calidad del proceso. Se evaluó la influencia de cuatro densidades de inóculo: 20; 40 (control); 60 y 80 explantes por frasco y un volumen de medio de cultivo por batería de 1200 ml; 2400 ml; 3600 ml y 4800 ml en la producción de explantes.

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y se evaluó:

- Coeficiente de multiplicación (unidades). Se determinó por el número de brotes finales con respecto al número de brotes iniciales.
- Altura de los brotes de yemas axilares (cm). Se realizó con una regla graduada y se midió desde la base del pseudotallo hasta la inserción de la primera hoja.
- Grado de oxidación según escala de Novak *et al.* (1994)
 - Grado 0: no hubo oxidación, coloración del explante de blanco-amarillo crema.
 - Grado 1: Incipiente coloración carmelita sin llegar a la necrosis del tejido.
 - Grado 2: 25% de tejido necrótico en la base del explante.
 - Grado 3: 50% de tejido necrótico en la base del explante.
 - Grado 4: 75% de tejido necrótico en la base del explante con penetración.
 - Grado 5: 100% de tejido necrótico en la base del explante con penetración y se necesitan cortes profundos para lograr que la asimilación de nutrientes sea efectiva.
- Diámetro del pseudotallo de los brotes de yemas axilares (cm). Se realizó con el auxilio de una regla graduada y se midió el diámetro de la base del pseudotallo.
- Número de hojas de los brotes de yemas axilares (unidades). Se contaron las hojas que estaban abiertas.

Procesamiento estadístico.

Con los criterios de estadística descriptiva se realizaron las tablas que expresan los resultados procesados con estadística inferencial paramétrica (análisis de varianza de clasificación simple). La comparación múltiple de media se realizó según Tukey cuando se encontró homogeneidad de varianza, (Lerch, 1977). Se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C de la Universidad de Michigan (Bricker, 1993, citado por Guzmán y Castaño, 2002).

Resultados y Discusión

Efecto del tiempo y frecuencia de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal

Efecto del tiempo de inmersión.

El tiempo de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal influyó de forma significativa. Con un tiempo de inmersión de 10 minutos y una frecuencia cada 6 horas (4 inmersiones al día) se alcanzaron los mejores resultados para las variables evaluadas (coeficiente de multiplicación (3,10), diámetro del pseudotallo (0,46), número de hojas activas (2,26) y altura del explantes (2,76), excepto el grado de oxidación (2,65) donde se obtiene el menor valor con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión sobre las variables evaluadas en el clon de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB).

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	Hojas Activas	Altura (cm)
10 minutos	3,10 a	0,46 a	2,65 a	2,26 a	2,76 a
20 minutos	2,40 c	0,12 c	3,27 c	1,08 b	1,45 c
30 minutos	2,25 b	0,24 b	3,01 b	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

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Lo anterior demuestra la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las especies y fases de cultivo en la micropropagación, pues del ajuste del tiempo de inmersión depende en gran medida la eficiencia del empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (Escalona, 2006).

Efecto de la frecuencia de inmersión.

Al utilizar una frecuencia de 3 horas y 10 minutos de inmersión se obtienen los máximos valores para el coeficiente de multiplicación (5,90), diámetro del pseudotallo (0,62), número de hojas activas (3,54) y altura del explante (3,65) con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos excepto con el grado de oxidación donde se obtiene el menor valor (2,14) sin la presencia de brotes hiperhidratados (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la frecuencia de inmersión en los brotes axilares del cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB).

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	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

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Por el contrario, Cabrera (2009) con las frecuencias de inmersión cada doce y veinticuatro horas, en el clon de ñame 'Pacala Duclos' tuvieron menos posibilidades para asimilar nutrientes y acumular sustancias de reserva en comparación al tratamiento con cuatro inmersiones al día, en el cual los microtubérculos alcanzaron los mayores porcentaje de masa seca.

Los tiempos y frecuencias de inmersión que se ensayaron según las posibilidades de automatización, demostraron que con diez minutos de inmersión y tres horas empleados en los experimentos, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la producción y calidad de los brotes.

Determinación del volumen de medio de cultivo en el Sistema de Inmersión Temporal.

El volumen de medio de cultivo tuvo influencia sobre todas las variables evaluadas con la adición de 40 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 60 ml de medio de cultivo por explante obteniéndose los mejores resultados para el coeficiente de multiplicación (7,58), diámetro del pseudotallo (0,95), número de hojas activas (3,37) y altura del explantes (2,99) con diferencia significativa con los demás tratamientos no siendo así en cuanto al grado de oxidación donde se obtienen el menor valor (2,12), (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del volumen de medio de cultivo sobre las variables evaluadas en el cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB).

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	Hojas Activas	Altura (cm)
20 ml/explante	4,11 c	0,63 b	2,25 b	2,75 b	2,52 b
40 ml/explante	5,22 b	0,59 b	2,75 a	2,99 b	2,78 b
60 ml/explante	7,58 a	0,95 a	2,12 b	3,37 a	2,99 a
ES ±	0,29*	0,37 *	0,18 *	0,13*	0,14 *
CV (%)	10,45	11,26	12,96	12,96	12,10

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Cabrera (2009) en la medida que incrementó el volumen de medio de cultivo por planta *in vitro* se incrementó el número y la masa fresca de los microtubérculos de ñame en el clon 'Pacala Duclos'. Los mejores resultados se alcanzaron al emplear un volumen de 60 y 90 ml de medio de cultivo por planta *in vitro*.

Es importante notar que en la medida que se incrementó el volumen de medio de cultivo se obtuvo un mayor coeficiente de multiplicación, sin embargo, la calidad de los brotes constituyó un factor importante, el cual permitió definir un volumen adecuado de medio de cultivo, que minimiza el estrés hídrico en los brotes, particularmente en las primeras etapas del cultivo.

Determinación del momento de subcultivo en el Sistema de Inmersión Temporal.

A partir de los 18 días de realizado el subcultivo hubo un incremento del coeficiente de multiplicación (8,15), diámetro del pseudotallo (0,99), número de hojas activas (3,03) y altura del explante (1,46), siendo este superior pero sin diferencias significativas en cuanto a los demás tratamientos pero sí con el de 15 días de cultivo. Al analizar la variable grado de oxidación se obtiene el menor resultado (2,16) con diferencias respecto al resto. Por lo tanto el tiempo de subcultivos es a partir de los 18 días, pues a través de este período de proliferación se puede obtener una mayor cantidad de explantes en un menor tiempo y el material está menos expuesto a riesgo de contaminación (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del tiempo de subcultivos de los explantes en el cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB) en Sistema de Inmersión Temporal.

Tratamientos	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	Hojas Activas	Altura (cm)
15 días	5,16 b	0,84 b	2,50 a	2,99 b	1,18 b
18 días	8,15 a	0,99 a	2,16 b	3,03 a	1,46 a
21 días	8,04 a	0,97 a	2,60 a	3,01 a	1,42 a
25 días	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

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Escalona *et al.* (1999) para el cultivo de la piña demostraron que períodos prolongados promovieron la deformación de los brotes y por lo tanto afectaron el número de brotes que se podía obtener.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo con el uso del Sistema de Inmersión Temporal durante un período de 18 días de incubación, constituye una vía efectiva para incrementar el coeficiente de multiplicación en el cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB).

Determinación de la densidad de explantes por frasco.

La densidad de explantes por frasco también influyó en las variables evaluadas (Tabla 5), el mejor resultado se obtuvo con 60 explantes por frasco de 10 litros de capacidad, con los mayores valores numéricos en cuanto al coeficiente de multiplicación (8,45), diámetro del pseudotallo (0,99) y altura del explante (1,98) con diferencias significativas con todos los demás tratamientos excepto en cuanto al grado de oxidación (2,06) y el número de hojas activas (2,58) donde se obtienen el menor valor con diferencias significativas con los demás tratamientos.

Tabla 5. Determinación de la densidad de explantes en el cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB) en el Sistema de Inmersión Temporal.

Tratamientos	Coefficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado Oxidación	Hojas Activas	Altura (cm)
20 explantes	4,18 c	0,54 b	2,50 a	2,99 b	1,42 b
40 explantes	6,71 b	0,61 b	2,60 a	3,03 a	1,46 b
60 explantes	8,45 a	0,99 a	2,06 b	2,58 a	1,98 a
80 explantes	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

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la densidad de 60 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.

Según Posada *et al.* (2003) los mejores resultados para la multiplicación de los cultivares de banano 'FHIA-01' y 'FHIA-18' se alcanzaron con la densidad de cinco explantes y una frecuencia de inmersión de tres veces durante un minuto cada 24 horas, en frascos de Inmersión Temporal (Sistema RITA).

Los experimentos desarrollados permitieron incrementar de forma significativa el coeficiente de multiplicación en el cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB) en Sistema de Inmersión Temporal de 3,5 a 8,45 obteniendo plantas con características muy superiores a las obtenidas por el método de propagación convencional.

Referencias

- Aitken-Christie, J., Davies, H.E., Kubota, C., Kosai, T. Automation in Plant Tissue Culture. General introduction overview: Automation and environment control in *Plant Tissue Culture Kluwer*, Academic Publisher, Dordrech, pp.1-19. 1995.
- Alvard, D., Cote, F., Teisson, C. Comparison of methods of liquids medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*2: 55-61. 1993.
- Cabrera, M. Formación de microtuberculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) clon 'Pacala duclos' en Sistema de Inmersión Temporal como material vegetal de plantación. Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Santa Clara, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 2009.
- Escalona, M., Cid, M., Lezcano, Y., Capote, I., Yáñez, E., González, J. 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. 1999.
- Escalona, M. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual*, pp. 48-50. 2006.
- FAO. Boletín trimestral FAO de Estadísticas. 2010.
- Guzmán, O. A., Castaño, J. Reconocimiento de nemátodos fitopatógenos en plátanos 'Dominico hartón' (*Musa* AAB, Simmonds), 'Africa', 'FHIA-20' y 'FHIA-21' en Colombia. *Info Musa*, 11 (2): 34-35. 2002.
- Kitto, M. Commercial Micropropagation *HorScience*, 32(6): 1-3. 1997.
- Lerch, G. La experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Ed. Científica y Técnica. La Habana, p. 288. 1997.
- Novak, F., Afza, R., Duren, M. Fiel evaluation of tissue-culture bananas in grade oxidation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30: 569-574. 1994.
- Posada, P. L., Gómez, R., Reyes, M., Álvarez, L. 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. 2003.