

INFLUENCIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN LA MICROPROPAGACIÓN DE PLÁTANO (*Musa* spp.) Y MALANGA (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.)

Ana J. Rodríguez[✉], Arlene Rodríguez, S. Quintero, María de los A. Torres y Zoila Fundora

ABSTRACT. The success of plant tissue culture depends greatly on the proper nutrient medium. Murashige-Skoog medium (MS) has the necessary nutritional requirements for most vegetable species. It has been widely used to prepare commercial mixtures as BioCen formulated products. In this paper, BioCen formulated media were compared with traditionally prepared media in dasheen and banana propagation, with the objective to give high accuracy and advantage in culture media preparation. Multiplication index, plant number and plant height were evaluated using a randomized complete design through Duncan's test at 5 %. Results showed that VitroBase as well as VitroCen PLML can be employed in dasheen and banana micropropagation respectively under the described culture conditions.

RESUMEN. El éxito del cultivo de tejidos de plantas depende en gran medida del medio nutriente adecuado. El medio Murashige-Skoog (MS) reúne los requerimientos nutricionales necesarios para la mayoría de las especies vegetales y ha sido ampliamente utilizado en la preparación de mezclas comerciales, como es el caso de los formulados del Centro Nacional de Biopreparados de Cuba (BioCen). En este trabajo, se compararon medios formulados por BioCen con los preparados de la forma tradicional para la propagación de la malanga y el plátano, con el objetivo de disponer de medios más precisos y sencillos en su elaboración, sin afectar los resultados. Se evaluó el índice de multiplicación, así como el número y la altura de las plántulas, mediante un diseño completamente aleatorizado, utilizando la prueba de Duncan al 5 % para la comparación de medias. Los resultados mostraron que los formulados VitroBase y VitroCen PLML pueden ser empleados en la micropropagación de la malanga y el plátano en las condiciones de cultivo descritas.

Key words: micropropagation, culture media, *Musa* spp, *Xanthosoma sagittifolium*

Palabras clave: micropropagación, medio de cultivo, *Musa* spp, *Xanthosoma sagittifolium*

INTRODUCCIÓN

La micropropagación de plantas reviste gran importancia en Cuba, por la posibilidad de tener una mayor disponibilidad de semillas de alta calidad y asegurar el incremento de la producción en cultivos como los bananos y plátanos (*Musa* spp.), así como de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) (1, 2), los cuales poseen gran demanda en la población.

El éxito de los cultivos de células y órganos depende del origen del explante y del medio de cultivo (3), en el cual a su vez influyen los ingredientes básicos: nutrientes, azúcar, hormonas, así como los agentes gelificantes,

utilizados en la preparación de medios sólidos o semisólidos (4, 5, 6).

Existen en el mercado medios de cultivo adecuados para la propagación masiva de plantas (7), para lo cual el más empleado es el Murashige y Skoog (MS) (8), ya que contiene los requerimientos nutricionales necesarios para la mayoría de las especies vegetales y ha sido utilizado en la confección de mezclas comerciales. El Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) de Cuba utiliza las sales MS para desarrollar formulados de medios de cultivo, que satisfagan la alta demanda de productos para la biotecnología vegetal, en correspondencia con el desarrollo que esta ha alcanzado en el país.

El objetivo del presente trabajo es comparar los medios de cultivo formulados por BioCen con los medios preparados de la forma tradicional en la micropropagación de *Xanthosoma sagittifolium* y *Musa* spp., para conocer si el comportamiento del material vegetal es similar en ambos casos y disponer de medios más precisos y sencillos en su elaboración, sin afectar los resultados.

Ana J. Rodríguez, Investigador Auxiliar de la Dirección de Biotecnología Vegetal; Dra.C. Arlene Rodríguez, Investigador Auxiliar y S. Quintero, Investigador Titular de la Dirección de Agricultura Sostenible; Dra.C. María de los A. Torres, Investigador Auxiliar y Dra.C. Zoila Fundora, Investigador Titular de la División de Genética Vegetal, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Calle 2, esq. 1 CP 17 200, Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ asdir@inifat.co.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal, se emplearon secciones procedentes de un tercer subcultivo de la micropropagación del banano (*Musa spp*) clon 'Highgate' (AAA) y de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium*), clon 'Viequera'. Para la preparación de los medios controles se utilizaron las sales MS (8).

En el caso de la malanga se comparó el medio control con las variantes VitroBase y Sales MS formuladas por BioCen.

El formulado VitroBase contenía las sales MS, sacarosa y agar en su composición. En el caso de las variantes control y Sales MS (BioCen), se añadieron 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ de agar. En todos fueron añadidos 6 Bencilaminopurina: 4 mg.L⁻¹ y ácido indol acético: 1.2 mg.L⁻¹, reguladores del crecimiento empleados en la micropropagación de la malanga (9).

Para el plátano se utilizaron medios controles líquido y sólido, debido a que se compararon las variantes siguientes:

- ★ VitroCen PLML (formulado de BioCen para medios líquidos)
- ★ VitroCen PLML (formulado de BioCen al cual se le añadió agar)
- ★ VitroCen PLMS (formulado de BioCen para medios sólidos).

Los medios VitroCen tenían en su composición las sales MS, tiamina HCL: 1 mg.L⁻¹, 6 bencil amino purina: 4 mg.L⁻¹, ácido 3 indolacético: 0.65 mg.L⁻¹ y sacarosa: 30 g.L⁻¹. En los medios controles estos ingredientes se añadieron de la forma tradicional. El agar estaba incluido en el medio VitroCen PLMS, en los demás casos que se empleó el medio sólido, se le añadieron 7 g.L⁻¹ de agar.

La esterilización de los medios se realizó en un autoclave a 121°C, durante 20 min. y 1.2 atm. de presión. El pH fue ajustado a 5.8. Los cultivos fueron mantenidos en un fotoperíodo de 16 horas -luz y 26± 1°C de temperatura.

Antes y después de la preparación de los medios se realizó una evaluación a las formulaciones elaboradas por BioCen y se analizaron los siguientes indicadores: apa-

riencia del polvo, apariencia del medio reconstituido, pH antes de la esterilización, apariencia del medio después de la esterilización y homogeneidad del gel.

A los 25 días de colocados los explantes en los medios de cultivo, se evaluaron el número, la altura de las plántulas y el índice de multiplicación (considerado como el número de secciones provenientes de un subcultivo, que serían empleados como material de partida para otra multiplicación).

En ambas especies se analizaron 20 réplicas por tratamiento y los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante un análisis de varianza, con un diseño completamente aleatorizado utilizando la prueba de Duncan al 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se exponen los resultados de las características de las formulaciones elaboradas por BioCen antes y después de su preparación. Se apreció su consistencia fina y homogénea, pero tenían diferencias en la coloración y en algunos agregados suaves que presentaba la formulación VitroBase, al parecer por hidratación, ya que se ha planteado que los medios en forma de polvos son altamente higroscópicos (7).

Al observar los medios reconstituidos, se apreció buena solubilidad en el caso del VitroCen PLML, que no presentó turbidez ni precipitado. En los medios VitroCen PLMS, VitroBase y sales MS (BioCen) se observó turbidez, por lo que hubo dificultades para apreciar la solubilidad. En los dos primeros casos pudo deberse al agar, que al no haberse realizado la cocción no estaba disuelto. En las sales MS (BioCen) sí se puede decir que no hubo buena disolución, por lo que se observó precipitado con sales de color blanco, que mejoró muy poco con el calentamiento, pero sí con la fusión; después de esta, la apariencia de los medios fue transparente y con buena homogeneidad.

El pH de los medios antes de la esterilización fue diferente en todos los casos, lo que no pareció afectar, ya que todos los pH fueron ajustados a 5.7.

Tabla I. Resultado de las características de las formulaciones BioCen, utilizadas en la multiplicación de plátano y malanga, antes y después de su preparación

Características	VitroCen PLML	VitroCen PLMS	VitroBase	Sales MS
Apariencia del polvo	Fino, homogéneo y color blanco	Fino, homogéneo y color crema pálido	Fino, homogéneo, color crema pálido y algunos agregados suaves	Fino, homogéneo y color blanco amarillento
Apariencia del medio reconstituido	Soluble, no turbidez, no precipitado	Poco soluble, turbio	Soluble regular, turbio, precipitado color crema	Soluble regular, algo turbio, precipitado de sales
pH antes de la esterilización	6.27	5.50	6.62	6.69
Apariencia después de la esterilización	Transparente	Transparente y compacto	Muy suave	Transparente
Homogeneidad del gel	Buena	Buena	Buena	Buena

Al gelificar el VitroBase, su consistencia fue demasiado suave, aunque esto no afectó las variables estudiadas, mientras el VitroCen PLMS resultó muy compacto.

Al analizar los resultados estadísticamente (Tabla II), se pudo apreciar que en el caso del plátano existieron diferencias significativas entre las variables analizadas respecto a los diferentes medios de cultivo empleados, mientras que en la malanga no se presentaron diferencias significativas en el número de plántulas.

Tabla II. Medias y significación del índice de multiplicación, número y altura de las plántulas en el plátano

Medio de cultivo	Índice de multiplicación		Altura de las plántulas		Número de plántulas	
	Media	Sign.	Media	Sign.	Media	Sign.
Control líquido	3.65	ab	1.26	b	3.60	a
Control sólido	4.00	a	1.75	b	3.30	a
VitroCen PLML sin agar	2.90	b	3.88	a	2.65	a
VitroCen PLML con agar	3.60	ab	1.31	b	3.35	a
VitroCen PLMS	1.00	c	0.17	c	0.40	b
ES	±0.29	-	±0.19	-	±0.32	-

Letras comunes no difieren significativamente al 5 %

El índice de multiplicación es un factor muy importante a tener en cuenta en la propagación *in vitro*, ya que en dependencia de esto será el número de plantas que se obtendrán. En el caso del plátano, el medio VitroCen PLML con la adición de agar no tuvo diferencias significativas con los controles líquido y sólido. Además, no se observaron diferencias significativas entre el medio control líquido y el medio VitroCen PLML sin la adición de agar. Sin embargo, estos cuatro medios tuvieron diferencias significativas con el formulado VitroCen PLMS, que es el que posee el agar en la mezcla comercial.

Esa disminución del índice de multiplicación en el medio VitroCen PLMS (Tabla II), pudiera deberse a que este quedó muy compacto y por consiguiente los explantes no pudieron realizar una eficiente absorción de los nutrientes, trayendo como consecuencia una baja formación de plántulas y la altura muy pequeña. Se ha planteado que el incremento de la viscosidad de los medios puede afectar la tasa de difusión y, por tanto, la disponibilidad de los medios de cultivo (10, 11). Por otra parte, se señala que el agar puede limitar la absorción de los reguladores del crecimiento (12).

En la altura de las plántulas, el medio VitroCen PLML con la adición de agar (Tabla II) no presentó diferencias significativas con los controles líquido y sólido, aunque sí con el medio VitroCen PLML en que resultó mayor y VitroCen PLMS, que como se observó anteriormente sufrió afectación en todos los parámetros estudiados.

El número de plántulas tampoco presentó diferencias significativas entre los controles y los medios VitroCen PLML sólido y líquido.

El medio más efectivo fue el VitroCen PLML, porque además de no presentar diferencias significativas con su control en cada caso, tuvo una eficiente multiplicación y

la posibilidad de ser utilizado en medio líquido y sólido en dependencia del subcultivo a utilizar, en la multiplicación de plátano.

Al analizar estadísticamente los datos de los resultados de propagación de la malanga (Tabla III), se pudo apreciar que en el caso del índice de multiplicación no se observaron diferencias significativas entre los medios control y VitroBase, pero sí entre estos y el medio preparado con el formulado de sales MS (BioCen), que resultó menor.

Tabla III. Medias y significación del índice de multiplicación, número y altura de las plántulas en la malanga

Medio de cultivo	Índice de multiplicación		Altura de las plántulas		Número de plántulas	
	Media	Sign.	Media	Sign.	Media	Sign.
Control	4.05	a	5.26	b	2.00	NS
VitroBase	3.65	a	5.04	b	1.90	NS
Sales MS (BioCen)	2.45	b	6.26	a	1.45	NS
ES	±0.88	-	±0.90	-	±0.5	-

En estos resultados pudo haber influido que la disolución de las sales no fue buena, a pesar de haber mejorado la apariencia de los medios con la fusión, lo que no permitió la absorción de los nutrientes para el incremento de esta variable.

En el número de plántulas (Tabla III) no hubo diferencias significativas, aunque se manifestó una tendencia a la disminución fundamentalmente en el medio con sales MS (BioCen); sin embargo, en la altura de las plántulas se produjo un incremento en este medio. Esta es una variable que no resultó de mucho interés para la micropropagación, ya que la altura que presentaron las plántulas en los medios control y VitroBase fue adecuada para la adaptación posterior a condiciones ambientales.

Estos resultados concuerdan con los de otros autores (13), que plantearon la factibilidad de utilización de formulados para la micropropagación de plantas.

CONCLUSIONES

- La propagación *in vitro* de plátano en el formulado VitroCen PLML (utilizado como medio líquido o sólido) y de malanga en el formulado VitroBase tuvieron un comportamiento similar al observado con los medios elaborados a partir de los elementos del medio MS, por lo cual ofrecen la posibilidad de ser utilizados sin riesgos en cuanto a su efecto sobre el material biológico, y ofrecen ventajas en cuanto a una preparación más sencilla y precisa.
- El medio elaborado con la formulación VitroCen PLMS no es recomendable para su utilización en la propagación del plátano, ya que resultó muy compacto. El medio preparado con las sales MS (BioCen) no resultó efectivo en la propagación de la malanga, por lo que tampoco se recomienda.

REFERENCIAS

1. Quintero, S. /et al./ Recuperación del cultivo de la malanga (*Xanthosoma spp.*) mediante procedimientos biotecnológicos. En: Convención Trópico (1999:La Habana), 1999.
2. Orellana, P. /et al./ Empleo de la micropropagación para la introducción y generalización de clones híbridos de bananos. En: Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Redbio (3:1998:La Habana), p. 29-30.
3. Gamborg, O. L. /et al./ Plant tissue culture media. *In Vitro*, 1976, vol. 12, no. 7, p. 473-477.
4. Szabados, L., et al. Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Turrialba, 1991, p. 969.
5. Capote, A. /et al./ Evaluación de un agente gelificante cubano, Natugel, en el cultivo *in vitro* de plántulas de tomate. *Biotecnología Aplicada*, 2002, vol. 19, no. 1-2, p. 1-4.
6. Fuentes A. D. /et al./ Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28. *Biotecnología Aplicada*, 1998, vol. 15, p. 242-245.
7. Duchefa, B. V. Plant Cell and Tissue Culture Media. Biochemical Plant Cell and Tissue Culture Media. Catalogue 1998-1999. The Netherlands, 1999.
8. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473- 497.
9. Medero, V. /et al./ Optimización de la tecnología de micropropagación de la malanga. Biotecnología Habana'95. Libro de reportes cortos. Avances en Biotecnología Moderna, 1995, vol. 3, p. 11-18.
10. Singha, S. /et al./ Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentration of three commercial agars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1985, vol. 110, p. 407-411.
11. Caldas, L. S. /et al./ Meios nutritivos. En: Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. EMBRAPA, 1998.
12. Mohamed-Yasseen, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.*, 2001, vol. 37, p. 204-205.
13. Lovaina, T. /et al./ Desarrollo de medios deshidratados a escala mundial para la micropropagación de plantas. En: Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Redbio (3:1998:La Habana), p. 66-67.

Recibido: 17 de mayo de 2002

Aceptado: 2 de junio de 2003

Cursos de Verano

Precio: 320 USD

Las Oligosacarinas reguladoras de los mecanismos de defensa, del desarrollo y la diferenciación de las plantas

Coordinador: Dr.C. Ramón Iglesias Curbelo

Fecha: 23 al 27 de agosto

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu