

EFFECTO DE LA DENSIDAD DE EXPLANTES EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL, TIPO RITA® EN EL CULTIVAR 'INIVIT PV-0630'

Milagros Basail Pérez*, Victor Medero Vega y Jorge López Torres.

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

*Autora para correspondencia: sit.biotec@inivit.cu

Recibido: 24 de enero de 2020; Aceptado: 10 de junio de 2020

RESUMEN

Desde hace tres décadas se emplean las técnicas *in vitro* para la propagación clonal de *musáceas*. Sin embargo, la expansión de las técnicas de micropropagación, depende de la adaptación de nuevas metodologías que permitan automatizar parte de los procesos y mejorar la calidad de las plantas. En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), se ha desarrollado una nueva metodología para la propagación *in vitro* en Sistema de Inmersión, tipo RITA® para la multiplicación del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV-0630' (densidad de explantes y tiempo de cultivos) con buenos resultados. Se utilizaron diferentes densidades de explantes por sistema, tipo RITA® (10 (control), 20, 30 y 40 explantes) con un tiempo de cultivo cada ocho días. A partir de los resultados obtenidos, se pudo demostrar que el mejor resultado se obtuvo con una densidad de 30 explantes, obteniendo un coeficiente de multiplicación de 1:5,81, sin diferencias significativas con el tratamiento de 40 explantes, con un tiempo de subcultivo de ocho días, no siendo así, cuando se utilizaron densidades de 10 y 20 explantes por sistema, obteniendo un coeficiente de multiplicación de 1:2,1.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, cultivar, densidad de explantes, tiempo de subcultivos

EFFECT OF THE DENSITY OF EXPLANTS IN THE TEMPORARY IMMERSION SYSTEM, TYPE RITA® IN THE CULTIVAR 'INIVIT PV-0630'

ABSTRACT

In vitro techniques have been used for the clonal propagation of *musaceae* for three decades. However, the expansion of micropropagation techniques depends on the adaptation of new methodologies that allow automate part of the processes and improve the quality of the plants. A new methodology has been developed for *in vitro* propagation in Immersion System, type RITA® for the multiplication of the plantain cultivar 'INIVIT PV-0630' (density of explants and time of cultures) with good results at the Research Institute of Tropical Roots and Tuber Crops (INIVIT). Different explant densities were used per system, type RITA® (10 (control), 20, 30 and 40 explants) with a culture time every eight days. From the results obtained, it was possible to show that the best result was obtained with a density of 30 explants, obtaining a multiplication coefficient of 1:5,81, without significant differences with the treatment of 40 explants, with a subculture time of eight days, this is not the case when densities of 10 and 20 explants were used per system, obtaining a multiplication coefficient of 1:2,1.

Keywords: multiplication coefficient, cultivar, density of explants, time of subcultures

INTRODUCCIÓN

Las técnicas comerciales de micropropagación de plátanos y bananos hacen parte de la modernización de la agricultura en muchos países y han contribuido a mejorar las condiciones sanitarias de las plantaciones e incrementar su productividad. Los primeros trabajos sobre la obtención de plantas de plátano mediante las técnicas de organogénesis se informaron en 1972 (Ma y Shii, 1972); a partir de estos se han cultivado gran número de variedades y cultivares *in vitro* del género *Musa* spp.

La aplicación a escala comercial de estas técnicas se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, calidad de los explantes y altos costos ocasionados por el uso intensivo de mano de obra en las etapas de multiplicación y enraizamiento (Hahn *et al.*, 1989).

La automatización de una o más etapas en los procesos de micropropagación es una opción para la reducción de costos de manipulación, reducción del espacio e incrementar volúmenes de producción (Georgiev *et al.*, 2014).

Esta técnica de inmersión temporal ha sido aplicada por varios investigadores en diferentes especies con buenos resultados para la propagación masiva de musáceas, Ortega *et al.* (2011) en el cultivar de banano 'Williams', Pérez *et al.* (2002) y Hoyos *et al.* (2008) en dominico hartón, *musa* AAB cultivar 'Enano' y Ríos *et al.* (2013) para el cultivar de plátano 'Cambur manzano'.

La utilización de medios de cultivo líquidos en sistemas de inmersión temporal es una condición para lograr desarrollar esta alternativa (Aitken-Christie *et al.*, 1995). Teisson *et al.* (1996) desarrollaron un equipo sencillo de inmersión temporal, cuyo nombre comercial es RITA® (recipiente automático de inmersión temporal), el cual ha sido empleado para el cultivo de microesquejes, organogénesis y embriogénesis somática en varias especies de interés agrícola, (Vilchez y Albano, 2014; Albany *et al.*, 2015) con altas tasas de multiplicación, lo cual ha permitido disminuir los costos de producción y reducir riesgos de contaminaciones (Georgiev *et al.*, 2014).

El objetivo de la presente investigación fue incrementar la densidad de explantes en el sistema de inmersión temporal tipo RITA® que tributen a incrementar la producción y calidad de los brotes de plátano vianda en el cultivar 'INIVIT PV-0630'.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) en el periodo de noviembre de 2018 a febrero de 2019 con el objetivo de evaluar el efecto de la densidad de explantes en el cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV-0630' en sistema de inmersión temporal tipo RITA®.

Material vegetal. Para el desarrollo de los experimentos se utilizó el cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV-0630' procedente del banco de germoplasma de plátanos y bananos del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT).

Sistema de inmersión temporal. Se dispuso de un recipiente automático de inmersión temporal cuyo nombre comercial es RITA®.

Medio de cultivo y condiciones de incubación. Se utilizó el medio de cultivo basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) MS suplementado con 2,25 mg.L⁻¹ de 6-BAP; 0,18 mg.L⁻¹ de AIA; 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa; 1,0 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico en la etapa de multiplicación. El pH del medio se ajustó a 5,7 antes de esterilizarlo en autoclave a

121 °C y 1,1 kg.cm⁻² por 15 min. 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⁻²s⁻¹ y fotoperíodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

Procedimientos generales. Se determinó el número de explantes iniciales (10 (control), 20, 30 y 40 explantes) con un tiempo de subcultivo cada ocho días. Se utilizó un tiempo de inmersión de cinco minutos a una frecuencia cada tres horas. Las evaluaciones se llevaron a cabo a los ocho días de cultivo, donde se evaluó la siguiente variable: coeficiente de multiplicación. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

El coeficiente de multiplicación se calculó de la siguiente forma:

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

Procesamiento estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el software SPSS versión 15.0. Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Los datos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple y la comparación múltiple de medias se realizó según Test de Tukey con un nivel de significación de p<0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar la interacción tiempo de subcultivo y densidad de explantes, no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos de 30 y 40 explantes por frasco, pero sí con los demás tratamientos (10 y 20 explantes). El mayor coeficiente de multiplicación se obtuvo al emplear 30 explantes por RITA® (1: 5,8), Tabla 1; además se logró un mayor vigor de las plantas, así como un color verde más intenso de las hojas, Figura 1.

Tabla 1. Efecto de la densidad de explantes sobre las variables evaluadas en el cultivar 'INIVIT PV-0630'.

Tratamientos	Coeficiente de multiplicación
10 explantes	2,10 b
20 explantes	2,25 b
30 explantes	5,81 a
40 explantes	5,32 a
ES ±	0,07 *
CV (%)	11,01

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

La explicación a esta respuesta *in vitro* puede estar dada por la competencia entre los explantes, por el espacio en el recipiente o por las condiciones de oxigenación en estos sistemas RITA®. Además, con el empleo de estos sistemas es posible aumentar el coeficiente de multiplicación en relación con el medio de cultivo de multiplicación estático: semisólido y líquido.



Figura 1. Plantas producidas *in vitro* en sistema RITA® con una densidad de 30 explantes y un tiempo de subcultivo cada ocho días en el cultivar 'INIVIT PV-0630'.

Rodríguez y Morales (2015) al estudiar el efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy obtuvieron que en la variedad Brigitta se alcanza el mejor resultados con densidades entre 20 y 25 explantes por frasco en todos los volúmenes de medio de cultivo, mientras que en la variedad Legacy solo lo consiguió con la densidad de 25 explantes por frasco con altos volúmenes de medio de cultivo.

Vilchez *et al.* (2011) en la multiplicación en sistemas de inmersión temporal del Ocumo Blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) demostraron que con la densidad de nueve brotes/recipiente se obtuvo el máximo valor de brotes totales, de brotes menores a 5 mm y brotes mayores a 5 mm obteniendo un coeficiente de multiplicación de 1: 3,15 por lo que lograron mayor eficiencia para la multiplicación *in vitro* de Ocumo en sistema de inmersión temporal tipo RITA®.

Salazar y Hoyos (2007) señalaron que en la multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) una baja densidad de explantes en el sistema de inmersión temporal sería inadecuada porque se subutilizarían los recipientes de cultivo y se ocasionaría pérdida de medio de cultivo.

Basail *et al.* (2012) al utilizar una densidad de 70 explantes del cultivar 'FHIA-18' (AAAB) en frascos Nalgene de 10 litros de capacidad en el sistema de inmersión temporal obtuvieron un coeficiente de multiplicación de 1: 14,92.

Albany (2015) al utilizar una densidad de inóculo de 10 brotes en el cultivar de sábila (*Aloe barbadensis* Mill.) en cada RITA® obtuvo un incremento en el conjunto de variables evaluadas, resaltando el número de brotes nuevos por ser la variable de mayor interés para la multiplicación *in vitro* obteniendo un coeficiente de multiplicación de 1: 8,92 en la producción de los brotes en sistema RITA®, muy superior al obtenido con el resto de las densidades 6, 8 y 12 brotes.

Según Pérez (2013) en el cultivar *Digitalis purpurea* L. al utilizar una densidad de 12 explantes alcanzó una mayor altura (10,93 cm) y un mayor número de brotes por explante (1: 5,85). De igual manera, obtuvo los mayores valores en la masa fresca y masa seca por sistema de inmersión temporal y un menor contenido de agua en la biomasa producida por SIT respecto al tratamiento con una densidad de inóculo de 18 explantes.

Schumann *et al.* (2012) describieron la influencia de diferentes factores, entre ellos la densidad de inóculo en la producción de biomasa en brotes de *Leucojum aestivum* L. en sistemas de inmersión temporal. En su investigación refirieron resultados muy similares donde el incremento de biomasa varió en dependencia de la densidad de inóculo donde obtuvieron el mayor coeficiente de multiplicación (1: 6,09) en sistema de inmersión temporal de 1,0 L con una densidad de 10 gMF.

Basail *et al.* (2015) lograron multiplicar el cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal con una densidad de 70 explantes por frasco de cultivo obteniendo los mejores resultados en cuanto al coeficiente de multiplicación (1: 15,99), muy superior al obtenido con el resto de las densidades de explantes por frasco de cultivo (30, 50 y 90 explantes).

Orellana (1998), puntualizó la necesidad de valorar experimentalmente la densidad de explantes por frasco porque este parámetro pudiera ocasionar deficiencias en el sistema; ya que una baja densidad ocasionaría pérdidas de espacio y medio de cultivo, y con ello la subutilización de los recipientes.

De Feria *et al.* (1998), recomendaron para recipientes de 3,8 L de capacidad una densidad de 40 brotes de caña de azúcar por frasco, les permitió obtener mayor coeficiente de multiplicación (1:10,92) y un peso promedio de 5,74 mg por brote.

La superioridad del nuevo método entre otros aspectos está dada por el empleo del medio de cultivo en estado líquido, que a diferencia del semisólido facilita el aumento de la asimilación de los nutrientes por los explantes. Además, en estos sistemas los explantes no están constantemente en contacto con el medio de cultivo sino, sólo a determinada frecuencia y un período corto de tiempo que permite la renovación constante de la atmósfera interna de los frascos y evita la acumulación de gases nocivos como el etileno, así como facilita la regulación de la concentración de CO₂ y mejora la oxigenación de los tejidos. Los explantes retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de los nutrientes, lo cual se traduce en un crecimiento más vigoroso y mejor desarrollo. Además, estos aspectos positivos del sistema RITA®, favorecen la fotosíntesis de las plantas (Teisson y Alvard, 1997).

CONCLUSIONES

Se logró obtener una mejor respuesta *in vitro* en el cultivar 'INIVIT PV-0630' cuando se utilizó una densidad de 30 explantes por sistema RITA® obteniendo un coeficiente de multiplicación de 1: 5,81 con un tiempo de subcultivo a los ocho días.

BIBLIOGRAFÍA

- AITKEN-CHRISTIE, J.; H. DAVIES; C. KUBOTA and T. KOSAI. 1995. Automation in Plant Tissue Culture. General introduction overview: Automation and environment control in Plant Tissue Culture Kluwer, Academic Publisher, Dordrech, pp.1-19.
- ALBANO, E. 2015. Propagación *in vitro* de sábila (*Aloe barbadensis* Mill.) utilizando retardantes del crecimiento en sistemas de inmersión temporal. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor. Maracaibo, Venezuela-Noviembre. 120 p.
- ALBANY, N.; J. VILCHEZ; S. LEÓN; M. MOLINA; A. NAVA; L. MARTÍNEZ y M. MOLINA. 2015. Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de sábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2): 24-31.

- BASAIL, M.; V. MEDERO; J. VENTURA; E. OTERO; M. TORRES; J. LÓPEZ; M. CABRERA; A. SANTOS; A. RAYAS; M. BAUTA y Y. GARCÍA. 2012. Multiplicación del clon de banano 'FHIA-18' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1): 8-19.
- BASAIL, M.; V. MEDERO; Y. TORRES; A. ROBAINA; J. LÓPEZ; A. SANTOS; A. RAYAS; M. BAUTA; Y. BEOVIDES y Y. GUTIÉRREZ. 2015. Multiplicación del cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Agricultura Tropical*, 1(2): 32-41.
- DE FERIA, M.; E. JIMÉNEZ y M. CHÁVEZ. 1998. Influencia de la densidad de inóculo y la renovación del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido) utilizando sistema de inmersión temporal. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REBIO'98. 1-5 junio, La Habana, Cuba. Libro de Resúmenes, 42p.
- GEORGIEV, V.; A. SCHUMANN; A. PAVLOV y T. BLEY. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6): 607-621.
- HAHN; S. K.; D. VUYLSTEKE and R. SWENNEN. 1989. First reactions to ABB cooking bananas distributed in southeastern Nigeria. Proceedings of an international workshop, San José, Costa Rica, March 1989. INIBAP. Montpellier. p. 306-315.
- HOYOS, J.; P. ROMÁN y J. VELASCO. 2008. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la propagación de plátano dominico hartón (*Musa* AAB Simmonds). *Centro Agrícola*, 6(2): 99-104.
- MA, S. and C. SHII. 1972. *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *Journal of the Chinese Society of Horticultural*, 18(1): 135-142.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, pp. 473-497.
- ORELLANA, P. 1998. Introducción a la propagación masiva. En: Pérez, J. N. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología (Eds), Instituto de Biotecnología de las plantas, Universidad Central de Las Villas, J. N. Pérez Ponce (Ed.), Santa Clara, Cuba, pp.83-295.
- ORTEGA, D.; A. TAMAYO; J. CALDERÓN y R. GALVÁN. 2011. Establecimiento aséptico en la micropropagación *in vitro* de banano Williams AAA subgrupo Cavendish. *Tierra Tropical*, 7(2): 205-212.
- PÉREZ, O.; L. GARCÍA; I. BERMÚDEZ; V. VEITIA y C. ROMERO. 2002. Manejo hijuelos y ápices de cultivar de *Musa* spp. para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis cultivares *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 2(2): 77-81.
- PÉREZ, L. 2013. Sistemas de inmersión temporal, elicitación y transformación genética en *digitalis purpurea* L. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 122 p.
- RÍOS, G.; M. AÑEZ; M. RAMÍREZ; M. BRACHO; D. ARAÚJO; H. SUÁREZ. 2013. Cultivo *in vitro* de yemas tratadas con benciladenina proveniente de cormos enteros o seccionados de plátano, 'Cambur Manzano'. *Bioagro*, 25(2): 137-142.
- RODRÍGUEZ, B. y D. MORALES. 2015. Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1): 94-102.

- SALAZAR, R. y R.A. HOYOS. 2007. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 60 (2): 3907-3921.
- SCHUMANN, A.; S. BERKOV.; D. CLAUS.; A. GERTH; J. BASTIDA and C. CODINA. 2012. Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. *Appl Biochem Biotechnol*, 167(7):1907-1920.
- TEISSON, C.; D. ALVARD; B. BERTHOULY; F. COTE; J. ESCALANT; H. ETIENNE and M. LARTAUD. 1996. Simple apparatus to perform Plant Tissue Culture by temporary immersion. *Acta Horticulturae*, 440: 521-526.
- TEISSON, C. y D. ALVARD. 1997. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas 'BIOVEG' 97. Libro de resúmenes, pp. 25-26.
- VILCHEZ, J.; N. ALBANO; L. MARTÍNEZ; M. MOLINA; C. PIRELA; M. MOLINA; C. ALVAREZ y J. CHIRINOS. 2011. Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1): 94-102.
- VILCHEZ, J. y N. ALBANY. 2014. Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2):96-103.