

ORIGINAL

Multiplicación *in vitro* del clon de plátano inivit pv 06-30 (*musa spp*) en condiciones de biofábricas

In vitro multiplication of *banana* clon INIVIT PV 06-30 (*Musa spp*) in biofabricas conditions

Angel Luis Espinosa Reyes, Máster en Ciencias Agrícolas, Profesor Auxiliar, Universidad de Granma. Cuba, aespinosar@udg.co.cu

Juan José Silva Pupo, Doctor en Ciencias Agrícolas Profesor Auxiliar, Universidad de Granma. Cuba, jsilvap@udg.co.cu

Miguel Caise García, Ingeniero Agrónomo, Biofábrica de Holguín, Empresa de Semillas, Cuba.

RESUMEN

El perfeccionamiento de las metodologías para la multiplicación *in vitro* de los cultivos es una necesidad constante en los procesos productivos, desarrollados en las biofábricas. El trabajo se realizó con el objetivo de evaluarla influencia del estado físico, la concentración de macroelementos del medio de cultivo y el número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* del clon de plátano INIVIT PV-06-30 en condiciones de biofábrica. El material vegetal utilizado fueron plantas establecidas *in vitro* a partir de meristemas. Se evaluaron tres concentraciones de los macroelementos incluidos el medio de cultivo de Murashigue y Skoog (1962): (100%, 75% y 50%) en combinación con dos estados físicos del medio de cultivo (semisólido y líquido) durante seis subcultivos consecutivos. Los resultados muestran valores mayores del coeficiente de multiplicación, longitud del brote, largo y ancho de las hojas en el medio de cultivo con los macroelementos al 100% de su concentración, independientemente de estado físico del medio de cultivo. El coeficiente de multiplicación fue bajo en todos los subcultivos, sin diferencias significativas a partir del segundo.

PALABRAS CLAVES

Micropropagación; coeficiente de multiplicación; biofábrica; subcultivo; medio de cultivo

ABSTRACT

The improvement of the methodologies for *in vitro* multiplication of crops is a constant need in productive processes developed in biofactories. The influence of the physical status, macroelements's concentration in culture medium and the subcultures number were evaluate to *in vitro* multiplication of banana INIVIT PV 06-30 clon's in biofactory conditions. *In vitro* plants from meristems were using as plant material. Three concentrations (100 %, 75 % and 50 %) of

the macroelement's included in Murashigue y Skoog (1962) culture medium were evaluated in combination with two physical status of the culture medium (semisolid and liquid) during six subcultures. The results show higher values of coefficient of multiplication, length of the shoot and length and width of the leaves in the culture medium with the macroelements at 100 % to their concentration, regardless of the physical state of the culture medium. The coefficient of multiplication was low in all subculture, without differences from the second.

KEYWORDS

Micropropagation, coefficient of multiplication; biofabrica; subcultures; culture medium

INTRODUCCIÓN

El plátano es el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. Es considerado un producto básico y de exportación y constituye una importante fuente de empleos e ingresos en numerosos países en desarrollo (Galán *et al.*, 2018)

Los plátanos constituyen una importante fuente de carbohidratos y contribuyen a la seguridad alimentaria de millones de personas en África, el Caribe, Latinoamérica, Asia y el Pacífico (Eroskiconsumer.com, 2012)

El aumento poblacional, y el consecuente incremento en la demanda de alimentos, requieren el uso de técnicas que permitan aumentar los volúmenes de producción sin elevados costos y la búsqueda de nuevas variedades o clones que satisfagan las demandas de la población y respondan a las exigencias del mercado.

Las técnicas que toman como base el cultivo de tejidos vegetales cuando son bien empleadas, pueden aumentar los volúmenes de producción en periodos de tiempo más cortos en comparación a las técnicas tradicionales (Pérez, 1998)

En la actualidad el método de obtención de plantas por vías biotecnológicas más utilizado es la micropropagación (Cruz *et al.* 2016), industria que lleva varios años de explotación y se le augura un excelente futuro.

En Cuba, se llama biofábricas a las entidades productivas encargadas de la producción masiva de plantas mediante la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos. Este proceso se lleva a efecto mediante metodologías de propagación previamente establecidas, sin embargo, cuando se orienta la propagación de una nueva variedad o clon, se hace necesario perfeccionar y adaptar las metodologías de propagación establecidas.

El clon de plátano INIVIT PV 06- 30 (mutante obtenido a partir del cultivar Zanzíbar (AAB), ofrece ventajas con respecto a otros clones comerciales como son: un porte bajo, que lo hace más resistente a los vientos, buenos rendimientos agrícolas y buena aceptación por los consumidores y

productores (Ventura, 2010).

La propagación de este clon en biofábricas ha sido orientada por el Ministerio de la Agricultura de Cuba, sin embargo, en este proceso se han presentado una serie de dificultades entre las que sobresalen los bajos coeficientes de multiplicación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia del estado físico, la concentración de macroelementos del medio de cultivo y el número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* del clon de plátano INIVIT PV-06-30 en condiciones de biofábrica.

POBLACIÓN Y MUESTRA

Etapa de establecimiento in vitro

Se utilizaron plantas jóvenes del clon de plátano INIVIT PV 06-30 con una altura promedio de 40 cm provenientes de un banco de germoplasma en el campo. Se colocaron a la sombra durante dos días para provocarla pérdida de agua. Transcurrido este tiempo, se realizó el primer mondado hasta que los cormos alcanzaron un tamaño de 5 cm de altura por 2,5 cm de base, se lavaron con agua corriente, detergente y cepillo y se realizó la primera desinfección utilizando hipoclorito de sodio al 3% durante 20 minutos, se lavaron con agua estéril y se pusieron a escurrir en frascos previamente esterilizados y tapados. El segundo mondado se realizó en condiciones semicontroladas del laboratorio hasta que el corno alcanzó un tamaño de 3 cm de altura por 1,5 cm de base y se realizó la segunda desinfección siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Los cormos se llevaron a la cabina de flujo laminar donde se redujo el tamaño a 1,5 cm de altura por 1 cm de base, decapitándolos 2 mm por encima de la base de las hojas.

Posteriormente se cultivaron en frascos de vidrio que contenían 10,0 ml de medio de cultivo líquido constituido por sales de Murashige y Skoog (1962) suplementadas con mioinositol 100 mg/L, tiamina 2 mg/L, 6-BAP 4 mg/L, sacarosa 40 g/L, ácido cítrico 0,05 g/L y AIB 2,3 mg/L. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 y se autoclaveó durante 15 minutos a una temperatura de 121°C y presión de 111,48 kPa.

Los ápices cultivados se mantuvieron en el flujo laminar durante 5 días, revisándose diariamente para detectar contaminación microbiana.

Etapa de multiplicación in vitro

El material vegetal inicial para esta fase fueron meristemos establecidos *in vitro*, a los que se cortó la parte foliar y se eliminaron las zonas oscuras, luego se dividieron longitudinalmente en dos o tres partes según su tamaño. Las partes provenientes de cada explante fueron cultivadas en un mismo frasco, en todos los casos se colocaron con la base hacia abajo sobre el medio de

cultivo.

El medio de cultivo basal para este experimento fue el constituido por las sales de Murashige y Skoog (1962), suplementadas con mioinositol 100 mg/L, tiamina 2 mg/L, 6-BAP 2,25 mg/L, sacarosa 40 g/L, ácido cítrico 0,05 g/L y AIA 0,18 mg/L. El pH se ajustó a 5,8.

Los tratamientos evaluados consistieron en la combinación de tres concentraciones de los macroelementos del medio de cultivo MS (100%, 75% y 50%) y dos estado físicos del medio de cultivo (semisólido y líquido), según se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos evaluados

Tratamiento	Concentración de los macroelementos (%)	Estado físico del medio de cultivo
1	100	semisólido
2	100	líquido
3	75	semisólido
4	75	líquido
5	50	semisólido
6	50	líquido

Se realizaron 5 subcultivos sucesivos a medios de cultivos frescos con un intervalo de 21 días.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con 10 repeticiones por cada tratamiento (cada frasco se consideró una repetición).

Las condiciones generales para el crecimiento de los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en cámaras de luz artificial con una humedad relativa de 75-80%.

Cada 21 días (momento del subcultivo) se evaluaron los variables siguientes:

- Longitud del brote (cm). Se determinó midiendo desde la base del falso tallo hasta la intersección de la última hoja.
- Largo de las hojas (cm). Determinado desde la intersección del falso tallo hasta el ápice de la hoja.
- Ancho de las hojas (cm). Se determinó por la parte más ancha en la hoja del medio.
- Coeficiente de multiplicación. Se determinó por conteo de los brotes nuevos que tenían condiciones para el desarrollo.

Análisis Estadísticos.

Para el procesamiento estadístico de los datos, la normalidad fue comprobada por la prueba de

Kolmogorov- Smirnov y la homogeneidad de varianza por el test de Levene.

Para el análisis de los datos fue realizado un análisis de varianza simple. Se utilizó el paquete estadístico STATISTICA versión 7.0 sobre Windows. En todos los casos cuando existieron diferencias significativas entre las medias se aplicó la prueba de comparación múltiples de rango de Tukey para $p \leq 0,05$.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Cañal *et al.* (2001), señalaron que la composición y la concentración mineral de los medios de cultivo, así como el ambiente del cultivo condicionan totalmente la respuesta de los cultivos en cuanto al crecimiento y las características fisiológicas de las plantas obtenidas.

En la figura 1, se muestra una tendencia general a reducirse el coeficiente de multiplicación a medida que se disminuye la concentración de macroelementos en el medio de cultivo.

El mayor coeficiente de multiplicación se obtuvo en el tratamiento 2 con valores de 2,60 sin diferencias significativas con el tratamiento 1 (2,16), pero significativamente superiores al resto de los tratamientos. Los valores más bajos se lograron al emplear el medio de cultivo con los macroelementos al 50%, tanto para el medio de cultivo líquido como semisólido.

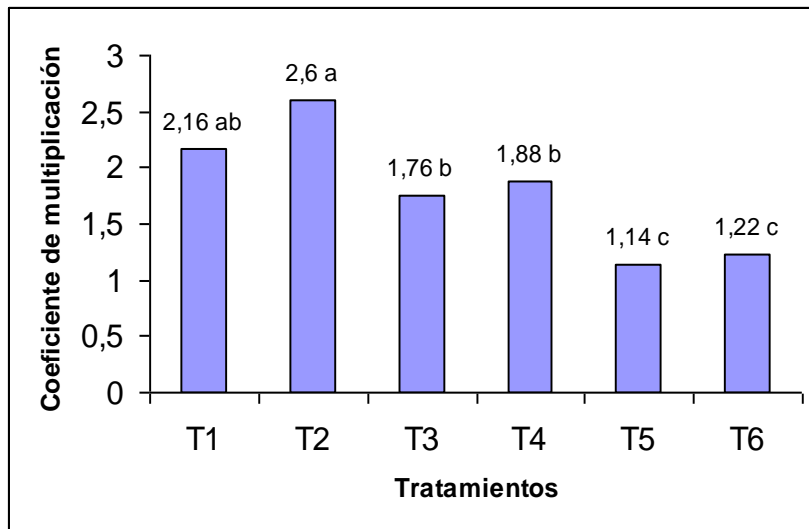


Figura 7. Efecto de los tratamientos en el coeficiente de multiplicación. Error estándar

$(ESx)(\pm) = 0,04$

De manera general pudo observarse que las vitroplantas obtenidas en los medios de cultivo con mayores concentraciones de los macroelementos (T1 y T2) mostraron un mayor desarrollo que las del resto de los tratamientos, con hojas totalmente extendidas y de color verde intenso. Las vitroplantas cultivadas en las menores concentraciones de macroelementos (T5 y T6) mostraron un color amarillento, hojas poco desarrolladas, algunas de ellas con manchas oscuras y necrosamiento en las puntas, su crecimiento fue lento, síntomas claros de deficiencia de

nutrientes.

En la tabla 2, se observan dos tendencias generales, primera la disminución de los valores de las variables evaluadas a medida que disminuye la concentración de macroelementos del medio de cultivo y la segunda que existieron diferencias significativas en relación con el estado físico del medio de cultivo. Los mayores valores de longitud de los brotes se alcanzan en los tratamientos 1 y 2 con valores de 2,24 y 2,42 cm respectivamente, sin diferencias entre ellos, pero significativamente superiores al resto de los tratamientos, seguidos por los tratamientos 3 y 4, en los cuales se alcanzan valores de 1,85 y 1,88 significativamente superiores a los tratamientos en los que se emplean la menor concentración de los macroelementos, en los cuales se obtienen los menores valores (1,40 y 1,46 cm respectivamente).

Tabla2. Efecto de los tratamientos en la longitud de los brotes, ancho y largo de las hojas.

Tratamientos	Longitud de los brotes (cm)	Largo de las hojas (cm)	Ancho de las hojas (cm).
T1	2,24 a	1,35 b	0,84
T2	2,42 a	1,55 a	0,92
T3	1,85 b	1,19 c	0,81
T4	1,88 b	1,29 bc	0,86
T5	1,40 c	1,0 d	0,69
T6	1,46 c	0,97 d	0,68
ESx(±)	0,02	0,01	0,01 NS

Es x(±): Error estándar de la media. (Medias con letras diferentes difieren estadísticamente según Tukey para $p \leq 0,05$).

El largo de las hojas en cuando se utilizan los macroelementos al 100% de su concentración en medio de cultivo líquido (T2), es significativamente superior al resto de los tratamientos con valores de 1,55 cm, seguido por los tratamientos 1 y 4, los cuales no difieren entre ellos, pero sí con el resto de los tratamientos. Los menores valores se obtienen al emplear los macroelementos al 50% de su concentración en el medio de cultivo.

El ancho de las hojas no muestra diferencias significativas entre los diferentes tratamientos evaluados.

Estudios realizados para la conservación *in vitro* de meristemos de Paraíso (*Meliaazedarach*) durante un periodo de seis meses mostraron que la reducción de las sales MS hasta un 25% de su concentración, provocó una reducción significativa en el crecimiento y desarrollo de las

plantas (Mroginski y Scocchi, 1998). Similar comportamiento han sido observados en otros cultivos y plantas ornamentales como en caña de azúcar (García *et al.*, 1999), Anthurium (Trujillo *et al.*, 2001), clavel español (Jiménez *et al.*, 2016) y *Euphorbia leucocephala* Lotsy (Martínez *et al.*, 2015).

Estudios realizados por Pierik (1987), para determinar el coeficiente de multiplicación del cultivar de plátano híbrido FHIA-20 (AAAB) en medios de cultivos líquido se obtuvieron bajos coeficiente de multiplicación en comparación con el medio semisólido, resultados que no coinciden con los obtenidos en el presente trabajo.

En la figura 2 puede observarse que el coeficiente de multiplicación en el subcultivo 1 es significativamente superior al resto con valores de 2,31. En el resto de los subcultivos el coeficiente de multiplicación no alcanza el valor dos, con valores que no difieren entre estos tratamientos.

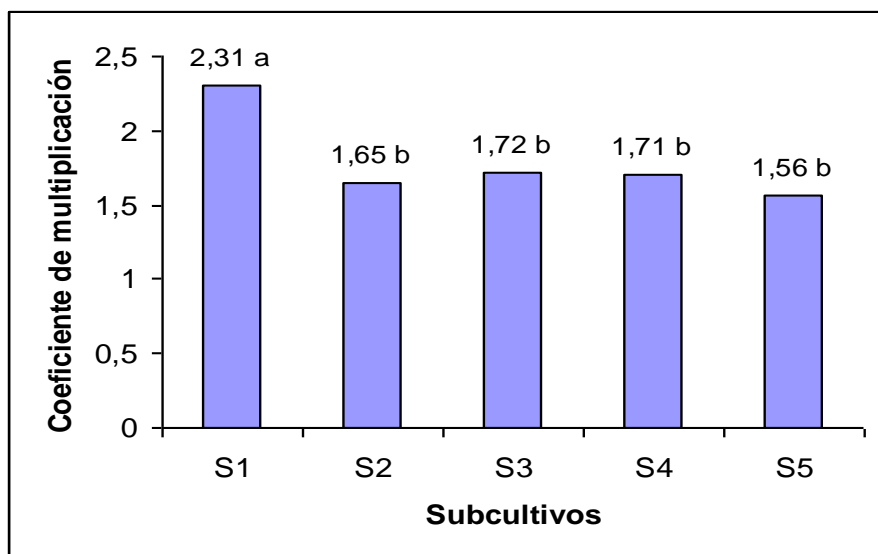


Figura 2. Efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación.

ESx(±) = 0,05 (Error estándar de la media)

Los resultados obtenidos muestran que en este cultivar el coeficiente de multiplicación es bajo y mantiene esa tendencia en los diferentes subcultivos, estos resultados coinciden con los criterios emitidos por directivos y productores de diferentes biofábricas de Cuba, quienes señalan que la principal limitante para la micropropagación de este clon son los bajos índices de multiplicación.

Un estudio sobre el comportamiento del coeficiente de multiplicación de varios cultivares de *Musa* sp durante seis subcultivos realizado por García *et al.* (2002), muestra diferencias notables en el comportamiento de los diferentes cultivares evaluados en los distintos

subcultivos realizados.

Al analizar el efecto del número de subcultivos en la multiplicación de yemas adventicias por explante (Jiménez, 2017), pudo apreciar que fue aumentando a medida que aumentaron los subcultivos para los tratamientos estudiados (seis y siete) de ambos cultivares. Mientras que la formación de brotes por explante disminuyó a medida que aumentaron los subcultivos para dichos tratamientos de manera general

En el cultivo de la cúrcuma, la multiplicación *in vitro* durante cuatro subcultivos cada 30 días produjo un incremento notable del número de brotes por explante, en el segundo y tercer subcultivo, con respecto al primero, para luego disminuir en los siguientes (Espinosa *et al.*, 2009).

En la tabla 3, se muestra el efecto del número de subcultivos en la longitud de los brotes, ancho y largo de las hojas. Los mayores valores de la longitud del brote (2,19 cm y 1,97 cm) se alcanzaron en los subcultivos 3 y 5 respectivamente, significativamente superiores al resto de los tratamientos.

Tabla 2. Efecto del número de subcultivos en la longitud de los brotes, ancho y largo de las hojas.

Subcultivos	Longitud de los brotes (cm)	Largo de las hojas (cm)	Ancho de las hojas (cm).
S1	1.74 b	1.28 b	0.73 bc
S2	1.74 b	1.06 c	0.63 c
S3	2.19 a	1.07 c	0.64 c
S4	1.74 b	1.21 b	0.83 b
S5	1.97 ab	1.50 a	1.08 a
ESx(±)	0.03	0.01	0.01

ESx(±): Error estándar de la media. (Medias con letras diferentes difieren estadísticamente según Tukey para $p \leq 0,05$).

Los mayores valores del largo y ancho de las hojas corresponden al subcultivo 5 (1,50 cm y 1,08 cm respectivamente), los cuales fueron significativamente mayores al resto de los tratamientos. Los valores más bajos en estas variables se logran en los subcultivos 2 y 3 con valores de 1,06 y 1,07 cm para el largo de las hojas y 0,63 y 0,64 cm para el ancho.

CONCLUSIONES

1-. El coeficiente de multiplicación, la longitud de los brotes, el largo y ancho de las hojas, fueron significativamente superiores al utilizar los macroelementos al 100% de su

concentración, independientemente del estado físico del medio de cultivo.

2-. El número de subcultivos no influyó positivamente sobre el coeficiente de multiplicación del clon de plátano INIVIT PV 06-30, obteniéndose valores inferiores a dos a partir del segundo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cañal, M., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R. y Majada, J.P (2001). Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, (1): 3-9.
2. Cruz, N., Canchignia, H., Morante, J., Nieto, E., Cruz, Y. y Cabrera, D. (2016). *In vitro* propagation of the Orito banana cultivar (*Musa acuminata* AA). *Biotecnología Aplicada*, 33 (4): 4201-4204.
3. Eroskiconsumer.com. El plátano. Origen y variedades. Consultado el 8 de mayo 2012. <http://frutas.consumer.es/documentos/frescas/platano/intro.php>. 2012
4. Espinosa, A., Silva, J.J., Borge, M., Fajardo, L., Pérez, J., González, O. y Sariego, S. (2009). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Curcuma longa* L. (2009). *Biotecnología Vegetal* 9 (1): 53 – 59.
5. Galán, V., Rangel, A., López, J., Pérez, J.B., Sandoval, H. (2018). Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, 40 (4): 1- 22.
6. García, I., Pérez, B., Sarría, Z y Clavero, J. (2002). Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIAT -20. *INFOMUSA*, 11(1): 35-37.
7. García, I., Rodríguez, M., Martínez, Y., Sarría, B. y Pichardo, T. (1999). Aplicación de la Biotecnología en la conservación de los recursos fitogenéticos de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido). Libro de Reportes Cortos. V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. Villa Clara.
8. Jiménez, I., Silva, J.J., Borges, M y Fonseca, M. (2016). Conservación *in vitro* del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) a partir de sales minerales. *Agronomía. Mesoamericana*, 27 (1): 177-181.
9. Jiménez, A. (2017). Obtención de yemas adventicias *in vitro* en los cultivares de *Musa* ‘Manzano’ (AAB) y ‘Gros Michel’ (AAA). Trabajo de diploma. Universidad Central “Marta Abreus” de las Villas.
10. Martínez, I.M., Andrade, M., Colinas, M.T., Villegas, O.G., Castillo, A. y Alia, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38 (4): 369 – 374.

11. Mroginski, I y Scocchi, A. (1998). Conservación de germoplasma de Paraíso (*Melia azedarach*) mediante el cultivo de meristemas. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana. Cuba.
12. Murashigue, T. y Skoog, F.S. (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*, 15: 173-197.
13. Pérez, JP. (1998). Variación somaclonal. En: J. Pérez (Ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*, (pp. 105-121). Editora GEO. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba.
14. Pierik, R. (1987). *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands.
15. Trujillo, R., Concepción, O., Daquinta, M., Nápoles, I. y Barmaseda, M. (2001). Propagación *in vitro* de *Anthurium andraeanum* Lind. Variedad Sonate. *Biotecnología Vegetal*, (1): 33-38.
16. Ventura, JC. (2010). INIVIT PV 06-30. Nuevo clon de plátano vianda de porte bajo en Cuba. Instituto de Investigación de Viandas Tropicales. Santo Domingo. Villa Clara. Cuba.