

## Multiplicación de *Ipomoea batatas* clon 'INIVITB2-2005' en Sistema de Inmersión Temporal

Milagros Basail Pérez\*, Víctor Medero Vega, Manuel Cabrera Jova, Arletys Santos Pino, Marlenys Torres Delgado, Eneida Otero Gálvez, Alexi Ortega Ortiz, Jorge López Torres, Aymé Rayas Cabrera, Yoel Beovides García, Eriker Paz Chávez. \*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

Para el cultivo *in vitro* de *Ipomoea batatas* no se tienen referencias del uso de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), esto podrían contribuir a incrementar el número de plantas *in vitro* necesarias para la propagación masiva del clon 'INIVITB2-2005' con gran potencial productivo. El objetivo del trabajo fue multiplicar este clon en SIT de 200 ml de capacidad. Se determinó la influencia del tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo por explante y el tiempo de subcultivo sobre el crecimiento y multiplicación de las plantas *in vitro* en los SIT. En cada experimento se midió la longitud del explante (cm) y se cuantificó el número de entrenudos por explante y el número de hojas activas. Además, se determinó la masa fresca (g) de las plantas *in vitro* y se calculó el coeficiente de multiplicación. Los mejores resultados se alcanzaron al utilizar un tiempo y una frecuencia de inmersión de 10 minutos cada tres horas, 15 ml de medio de cultivo por explante con subcultivos cada 30 días. Con ello se alcanzó un coeficiente de multiplicación de 8.01.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, frecuencia de Inmersión, tiempo de subcultivo

### ABSTRACT

Use of temporary immersion system (TIS) have been not reported for *in vitro* culture of *Ipomoea batatas*. This technique would help to increase the number of plants needed for *in vitro* mass propagation of clone 'INIVITB2-2005' with great productive potential. The aim of this paper was to multiply this clone in TIS of 200 ml capacity. Influence of immersion time, frequency of immersion, volume of culture medium per explant and subculture time on growth and multiplication of *in vitro* plants in TIS was determined. Length of explants (cm) was measured. Number of internodes per explant and number of active leaves was quantified. Fresh mass (g) of *in vitro* plants and multiplication coefficient was also determined. The best results were achieved with an immersion frequency of 10 minutes every three hours, using 15 ml of culture medium per explant and subcultures every 30 days. A multiplication coefficient of 8.01 was reached.

Keywords: multiplication coefficient, immersion frequency, subculture time

### INTRODUCCIÓN

Los tubérculos tropicales se han convertido en cultivos de gran demanda nacional e internacional. Estos han incrementado su importancia estratégica en Cuba para la alimentación humana, animal y otros fines industriales. Es por ello que contar con métodos de propagación eficientes se convierte en un requisito indispensable para cualquier programa de producción de semilla.

El clon de boniato (*Ipomoea batatas* L.) 'INIVITB2-2005' tiene alto potencial productivo en 4 meses de ciclo con alrededor del 60 t.ha<sup>-1</sup> de raíces tuberosas por ciclo. Su follaje es vigoroso y puede ser sembrado los 12 meses del año, con una tecnología similar a la empleada actualmente para este cultivo.

Las técnicas de cultivo de tejidos se han empleado para la propagación de boniato en diferentes clones. Por ejemplo, Gosukonda *et al.* (1995) indujeron la

formación de brotes adventicios con tiazurón y Paneque *et al.* (2003) refieren su uso para la propagación de los genotipos Cemsa 78-354, Inivit 90-1, Inivit 93-1, Yabú-8 y Jewel. Sin embargo, los coeficientes de multiplicación no son elevados.

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) han sido utilizados en otras especies de plantas para solucionar este problema. En caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) de Feria *et al.* (2002) lograron aumentar la eficiencia en la multiplicación *in vitro*. (var. IBP 89-112), cuando emplearon sistemas de inmersión temporal con una capacidad de 3.7 litros. Sus resultados refieren que el coeficiente de multiplicación (10.92), fue significativamente superior con respecto al tratamiento control en medio de cultivo semisólido (4.48).

Para el cultivo *in vitro* de *Ipomoea batatas* no se tienen referencias del uso de los SIT y podrían

contribuir a incrementar el número de plantas *in vitro* necesarias para la propagación masiva del clon 'INIVITB2-2005' con gran potencial productivo.

Tomando en cuenta estos antecedentes, este trabajo tuvo como objetivo multiplicar el clon 'INIVITB2-2005' con el uso del Sistema de Inmersión Temporal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT).

Como material vegetal se utilizaron plantas *in vitro* de boniato clon 'INIVITB2-2005', procedente del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Las plantas habían sido propagadas vía organogénesis y se encontraban en tercer subcultivo.

Se emplearon como Sistemas de inmersión temporal (SIT) dos frascos de cultivo de 200 ml de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo (Escalona *et al.*, 1999). En cada frasco se colocaron ocho explantes (segmento de tallo de la planta *in vitro* de aproximadamente 1cm de longitud con una yema axilar) y 20 ml de medio de cultivo por explante.

El medio de cultivo estuvo compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 2 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 0.1 mg.l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 50 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa con un pH de 5.2.

Con el objetivo de determinar la influencia del tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo por explante y el tiempo de subcultivo sobre el crecimiento y multiplicación de las plantas *in vitro* en los SIT se diseñaron experimentos independientes. En cada uno se seleccionó el tratamiento de mejores resultados para ser empleado en el siguiente con otra de las variables en estudio.

Primeramente, se determinó el tiempo de inmersión (5, 10 y 15 minutos), a una frecuencia cada 6 horas y posteriormente, la frecuencia de inmersión (cada 3, 6 y 8 horas). Para ello se utilizó el tiempo de inmersión seleccionado en el experimento previo.

Para determinar el efecto del volumen de medio de cultivo por explante se utilizaron cuatro tratamientos: 10, 15, 20 y 25 ml.

Las evaluaciones se llevaron a cabo a los 25 días de cultivo en estos experimentos.

Finalmente, para la determinación del tiempo de subcultivo en el sistema de inmersión temporal se constituyeron cuatro tratamientos: 20, 25, 30 y 35

días de cultivo y se utilizó el mejor volumen de medio de cultivo por explante obtenido anteriormente.

En ambos experimentos se utilizó un tiempo de inmersión y la frecuencia seleccionadas en los experimentos precedentes.

En todos los experimentos se midió la longitud del explante (cm) y se cuantificó el número de entrenudos por explante y el número de hojas activas. Además, se determinó la masa fresca (g) de las plantas *in vitro* y se calculó el coeficiente de multiplicación (CM), mediante la fórmula:

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

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y fueron incubados a 27±2°C y luz artificial con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 62-68 μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y fotoperíodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

Con los criterios de estadística descriptiva se realizaron las tablas que expresan los resultados procesados. La comparación múltiple de las medias se realizó según la prueba de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fue posible multiplicar el clon 'INIVITB2-2005' en los SIT, las variables tiempo de inmersión y frecuencia de inmersión influyeron sobre el crecimiento y la multiplicación de las plantas *in vitro*. Al aplicar un tiempo de inmersión de 10 minutos con una frecuencia de inmersión cada tres horas (Tabla 1) se obtuvieron los mejores resultados para la longitud del explante (cm), número de entrenudos por explante, número de hojas activas, masa fresca y coeficiente de multiplicación con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos.

El tiempo de inmersión es considerado un factor importante en la respuesta morfogénica del material vegetal a micropropagar. Al respecto, Escalona (1999) para el cultivo de la piña (*Ananas comosus*) encontró que con un tiempo de inmersión de dos minutos con una frecuencia de tres horas se lograron los mayores incrementos en el coeficiente de multiplicación y por lo tanto se facilitó una mayor eficiencia en la asimilación de nutrientes por los explantes.

Igualmente, al utilizar una frecuencia de inmersión cada tres horas (ocho inmersiones por día) y 10 minutos se obtuvieron los máximos valores para las variables evaluadas, con diferencias significativas respecto al resto de los demás tratamientos (Tabla 2).

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión sobre el crecimiento y multiplicación de plantas *in vitro* de boniato 'INIVITB2-2005 en a los 25 días de cultivo SIT.

Tiempo de inmersión (min)	Longitud explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. Hojas Activas	Coef. Multip.	Masa fresca (g)
5	3.62 c	2.68 c	2.06 b	4.56 c	0.12 b
10	6.58 a	5.05 a	4.03 a	6.99 a	0.31 a
15	5.46 b	4.99 b	2.99 b	5.78 b	0.18 b
ES ±	0.42 *	0.29*	0.34 *	0.20*	0.11*
CV (%)	13.68	14.20	12.56	16.34	10.56

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 el crecimiento y multiplicación de plantas *in vitro* de boniato 'INIVITB2-2005 en a los 25 días de cultivo SIT.

Frecuencia de inmersión (h)	Longitud explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. Hojas Activas	Coef. Multip.	Masa fresca (g)
3	6.68 a	5.25 a	4.12 a	7.05 a	0.35 a
6	4.55 b	3.92 b	4.25 b	6.63 b	0.22 b
8	3.36 c	2.55 c	3.11 c	4.21 c	0.18 b
ES ±	0.31 *	0.26*	0.29 *	0.28*	0.09*
CV (%)	11.20	12.55	12.23	13.05	9.82

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

Otros autores han obtenido buenos resultados al variar el tiempo y la frecuencia de inmersión. Por ejemplo, Cabrera *et al.* (2005) emplearon un tiempo de inmersión de diez minutos y una frecuencia de 6 horas y obtuvieron un elevado número de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata*) (4.7) en el clon Pacala Duclos en frascos de inmersión temporal de cinco litros.

Así mismo, Colmenares y Jiménez (2003) en el banano 'Grande naine' (*Musa AAA*), con inmersiones cada cuatro horas y dos minutos obtuvieron un coeficiente de multiplicación de 7.5 y para veinte minutos cada cuatro horas un índice de multiplicación de 8.0 en frascos de 10 litros.

Los tiempos y frecuencias de inmersión que se ensayaron demostraron que con diez minutos de inmersión y tres horas empleados en los experimentos, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la multiplicación y calidad de los brotes, sin la presencia de multiyemas ni hiperhidricidad.

Por otra parte, el volumen de medio de cultivo tuvo influencia en el coeficiente de multiplicación con la adición de ocho explantes por frasco de cultivo de 200 mililitros de volumen total. El mayor valor se alcanzó cuando se empleó una relación de 15 ml de medio de cultivo (7.59) por explante con diferencias significativas con el resto de los demás tratamientos (Tabla 3).

Ziv (2005) en banano 'Grande naine' (*Musa AAA*) al utilizar 1 250 ml de medio de cultivo (62.5 ml por explante) en biorreactores de 2 500 ml de volumen total obtuvo un elevado coeficiente de multiplicación (15.10) con la adición de 20 explantes.

Según Castro y González (2002) para lograr un desarrollo en las técnicas de cultivo de tejidos es necesario proveer a las plantas con suficientes cantidades de nutrientes esenciales (incluyendo la sacarosa y carbono como fuentes de energía bajo condiciones heterotróficas), de tal manera que los nutrientes no sean un factor limitante para la multiplicación en el desarrollo de las plantas. De acuerdo con los resultados obtenidos en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden demostraron que con el empleo de un volumen de 500 ml de medio de cultivo con nueve explantes se logró un elevado coeficiente de multiplicación de 10.5 brotes y la mejor calidad de los brotes en términos de una mayor producción de masa seca.

En el experimento relacionado con la determinación del tiempo de subcultivo se comprobó que el mayor valor se alcanzó a partir de los 30 días de realizado el subcultivo (30 y 35 días) (Tabla 4), con diferencias significativas con los demás tratamientos (20 y 25 días de cultivo). Por lo tanto se seleccionó el tiempo de subcultivo de 30 días, pues a través de este período 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 3. Efecto del volumen de medio de cultivo sobre el crecimiento y multiplicación de plantas *in vitro* de boniato 'INIVITB2-2005 en a los 25 días de cultivo SIT.

Volumen por explante (ml)	Longitud explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. Hojas Activas	Coef. Multip.	Masa fresca (g)
10	4.86 c	3.92 c	3.70 c	5.63 d	0.08 d
15	6.98 a	5.22 a	4.36 a	7.59 a	0.30 a
20	5.19 b	4.46 b	4.02 b	6.42 b	0.18 b
25	5.28 b	4.25 b	3.93 b	5.98 c	0.11 c
ES ±	0.21 *	0.20*	0.26 *	0.30*	0.10*
CV (%)	10.32	11.49	10.58	11.25	9.98

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

Tabla 4. Influencia del tiempo de subcultivo sobre el crecimiento y multiplicación de plantas *in vitro* de boniato 'INIVITB2-2005 en a los 25 días de cultivo SIT.

Tiempo de subcultivo (días)	Longitud explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. Hojas Activas	Coef. Multip.	Masa fresca (g)
20	5.86 c	3.92 c	3.70 c	5.63 c	0.16 c
25	6.19 b	4.46 b	4.02 b	6.42 b	0.22 b
30	7.12 a	5.72 a	4.45 a	8.01 a	0.34 a
35	7.09 a	5.68 a	4.48 a	7.98 a	0.32 a
ES ±	0.25 *	0.32*	0.33 *	0.35*	0.10*
CV (%)	11.60	12.40	12.23	13.15	10.01

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



Figura 1. Plantas *in vitro* del clon de boniato 'INIVITB2-2005' multiplicadas en Sistema de Inmersión Temporal a los 30 días de cultivo en frasco de 200 ml de capacidad.

De forma general, los experimentos desarrollados permitieron incrementar significativamente el coeficiente de multiplicación en el clon de Boniato 'INIVITB2-2005' en Sistema de Inmersión Temporal, con un tiempo y frecuencia de inmersión de 10 minutos cada tres horas con un volumen de medio de cultivo por explante de 15 ml a los 30 días de cultivo (Figura 1).

## CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados en el trabajo permitieron demostrar que se mejora la multiplicación en el clon de Boniato 'INIVITB2-2005' en Sistema de Inmersión Temporal con el empleo de un tiempo de inmersión de 10 minutos a una frecuencia cada tres horas (8 inmersiones por día) con un volumen

de medio de cultivo de 15 ml por explante a los 30 días de cultivo, lo que garantizó la mejor respuesta de los explantes en cuanto al coeficiente de multiplicación.

## REFERENCIAS

- Cabrera, M, R G Kosky, M Basail, A Santos, V Mederos, J López, A Rayas, M García, J Ventura (2005) Production of yam microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83(1): 103-107
- Castro, D, González J (2002) Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. *Agricultura sostenible* 62(1): 68-78
- Colmenares, M, Jiménez C (2003) Multiplicación *in vitro* *Musa* spp. mediante el sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia* 20(4): 468-477
- de Fera Manuel, Jiménez Elio, Maité Chávez (2002) Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var. IBP 89-112. *Biotecnología vegetal* 2 (3): 143-147
- Escalona M, J C Lorenzo, B González, M Daquinta, JL González, Y Desjardins, C G Borroto (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems *Plant Cell Reports* 18(9):743-748
- Gosukonda, RM, Prakash, CS, Porobodessai A, Blay E, Peterson CM (1995) Thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology* 31:65-71
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco *Tissue Cultures. Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Ziv, M (2005) Simple bioreactor for mass propagation of plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 277-285