

Sistemas prototipos para la micropropagación por inmersión temporal

Prototype systems for micropropagation by temporary immersion

C. Giménez² y M. Colmenares²

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad del Zulia (BioVeLUZ), Departamento de Biología, Facultad de Experimental de Ciencias, Apartado postal 526, Maracaibo - Venezuela.

Resumen

El desarrollo de los sistemas de inmersión temporal ha permitido el empleo de medio líquido sin efectos colaterales como la vitrificación. Sin embargo el elevado costo de los recipientes comerciales para inmersión temporal automatizada (RITA) ha impedido su uso en países en desarrollo. En esta investigación se construyó un prototipo para inmersión temporal con insumos nacionales e importados. Este prototipo fue construido con dos frascos de vidrio de boca ancha (500 g) con tapas de plástico horadadas con dos orificios donde se colocan un par de conexiones plásticas de polipropileno de $\frac{1}{4}$ pulgada con tuercas y empacaduras de goma. Una conexión se usa para la recirculación del medio de cultivo entre los frascos y la otra para la entrada de aire esterilizado por filtración a través de un filtro de goma espuma. El objetivo de esta investigación fue evaluar el funcionamiento de los prototipos para el cultivo in vitro por inmersión temporal usando como modelo, la inducción de yemas axilares en *Musa* AAA cv. Williams, comparándolos con los RITA. Los microcormos fueron cultivados en un medio líquido compuesto por sales de M&S y vitaminas de Morel, suplementado con 2,5 mg/L de N⁶-benciladenina, en luz continua (30mM/m²s), con un tiempo de inmersión de 2 minutos cada 6 horas. El índice de multiplicación que se logró en los RITA fue 6,6 mientras que para los prototipos fue de 5,8, no encontrando diferencias significativas usando las pruebas no paramétricas de Kurskal Wallis y paramétrica de Tukey (p= 0,05 y 0,01). La mayor diferencia radica en que el costo de los prototipos es 1/4 de los RITA, son fáciles de mantener y pueden escalarse con facilidad.

Palabras clave: Inmersión temporal, Medios líquidos, *Musa*.

Recibido el 6-7-2004 ● Aceptado el 15-9-2004

^{1,2}Autor para correspondencia correo electrónico: cagimenez@intercable.net.ve; mcolmena@intercable.net.ve



Abstract

The development of temporary immersion system had allowed the use of liquid medium for micropropagation without collateral effects such as vitrification. However the high cost of RITA recipients had not permitted their use in developing countries. In this investigation is constructed a prototype for temporary immersion with national and imported goods. This prototype was constructed with two wide mouth flask (500 g) with two plastic lids perforated with two holes where were putted two $\frac{1}{4}$ inch plastic connections of polypropylene with screws and rubber packs. One connection were used for medium recirculation between flaks and the other for air imputes which was sterilized through a foam filter. The objective of this research was to evaluate the prototype performance for in vitro tissues culture by temporary immersion using as a working model, axillary shoot induction of *Musa* AAA cv. Williams, comparing with RITA recipients. The shoot tips were cultivated in a medium composed by M&S salts, Morel's vitamins, and supplemented with N⁶-benciladenine 2.5 mg/L with continues light (30M/m²s) and immersion times of 2 minutes each 6 hours a day. The multiplication indexes in RITAs were 6.6 and for the prototypes were 5.8. No significant differences were estimated by nonparametric Kurskal Wallis and parametric Tukey test at $p= 0.05$ and 0.01 . The mayor difference was found at product cost, that was $\frac{1}{4}$ of the commercial cost of RITA recipient and that the prototypes are easier to maintain and be scaled.

Key words: Temporary immersion, liquid medium, *Musa*.

Introducción

El empleo de medios líquidos es primordial para lograr la automatización de los procesos de cultivo in vitro (5). Sin embargo, el contacto constante de los explantes con el medio líquido puede producir vitrificación. A este respecto, para reducir o eliminar este problema se proponen sistemas donde el explante está en contacto intermitente con el medio líquido y se produce una renovación continua de la atmósfera del envase para evitar acumulación de gases tóxicos como el etileno (1). Para resolver estos problemas se desarrollaron los recipientes para la inmersión temporal, los cuales son sistemas

de cultivo que se basan en el contacto intermitente del medio líquido con los explantes por un corto periodo de tiempo. Mediante el uso de este sistema de micropropagación se puede incrementar considerablemente el coeficiente de multiplicación de brotes en comparación con las formas convencionales de propagación (7).

Para la aplicación de la inmersión temporal en la micropropagación se han construido aparatos como el descrito por Aitken-Christie y Davies (1), quienes reportan incremento en el número, peso y tamaño de los brotes de *Amelanchier x grandiflora* Rehd cultivados mediante contacto

intermitente con el medio de cultivo en frascos de 7 L de capacidad. Otros sistemas fueron desarrollados empleando unidades de filtración comercial Nalgene modificadas que conectan el compartimiento inferior (reservorio de medio) con el superior (reservorio de los explantes), mediante un tubo de silicona (10). A partir de este envase, se desarrolló un diseño comercial denominado RITA en el CIRAD Francia (9). Este último dise-

ño es el más difundido a nivel mundial pero los costos de importación y mantenimiento son muy elevados, lo que ha limitado su aplicación en los países en desarrollo.

El objetivo central de esta investigación fue desarrollar un prototipo de recipiente para la inmersión temporal de cultivos in vitro con insumos nacionales e importados de bajo costo de instalación y mantenimiento.

Materiales y métodos

Material Vegetal

Como material vegetal se utilizaron micro cormos in vitro con un peso fresco aproximado de 1 g del cultivar de *Musa* AAA cv. Williams, en un medio líquido suplementado con 2,5 mg/L de N⁶-Benciladenina según Colmenares y Giménez (4).

Diseño experimental y manejo de los explantes

Los microcormos usados como explantes fueron seccionados longitudinalmente para romper la dominancia apical.

Para la evaluación de la variable índice de multiplicación se siguió un diseño experimental con dos tratamientos que correspondieron a dos tipos de recipientes para la inmersión temporal, los RITA y los prototipos construidos en (BioVeLUZ). Cada tratamiento (recipiente) se inoculó con tres explantes y 10 repeticiones distribuidos siguiendo un diseño completamente aleatorizado por bloques.

Las condiciones de cultivo in vitro fueron, luz continua (30 mm/m²s), temperatura de 27 ± 3°C y un

tiempo de inmersión de 2 min cada 4 horas durante 40 días de cultivo.

Los resultados de cada tratamiento fueron analizados usando una prueba no paramétrica de Kurskal Wallis y paramétrica de Tukey mediante el programa Statistica V 5.5 (8).

Diseño y construcción del prototipo.

El sistema de inmersión temporal fue construido con frascos de vidrio con 500 g de capacidad, cubiertos por tapas de plástico (envases para almacenar alimentos). Las tapas fueron horadadas para abrir dos orificios donde se colocó un par de conexiones plásticas de polipropileno de ¼ pulgada con tuercas y empacaduras de goma (Nalgene 6149-0002). Una conexión se usó para recircular el medio de cultivo entre los frascos. La circulación del medio se logra al conectar los frascos por intermedio de estas conexiones con una manguera de silicona tratada con níquel (Nagelne 50, 8060-0060) que recorre desde el fondo de un frasco al fondo del otro.

La otra conexión del envase corresponde a la entrada de aire que es esterilizado por filtración a través de un filtro de goma espuma. Los filtros fueron diseñados con tubos cilíndricos de vidrio de 7 cm de largo y 5 mm de diámetro, rellenos con un cilindro de 70 mg de goma espuma del mismo tamaño del tubo de vidrio. En este sistema un frasco contiene los explantes y el otro el medio de cultivo líquido (figura 1). El flujo de aire que entra por el filtro aumenta la presión en el recipiente e impulsa el líquido a través de la tubería de silicona hacia el envase que contiene los explantes en donde el aire es desplazado por el medio de cultivo y sale por el filtro de aire de goma espuma, durante este

proceso las válvulas se abren, por una entra el aire y por la otra sale (figura 1). Este sistema completamente armado fue esterilizado en autoclave a 120°C, 1,5 kg/cm² durante 15 min.

Para el control de la inmersión en este sistema de doble envase se emplearon cuatro electro-válvulas plásticas, un temporizador programable digital de 6 ciclos de encendido/apagado con tiempo mínimo de 1 min, un compresor de aire y mangueras plásticas de polietileno rígido de 5/8 pulgadas, unidas con conexiones T para la distribución del aire a los sistemas. Estas mangueras y conexiones las distribuyen los comercios dedicados a sistemas de riego.

Resultados y discussion

Según las pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas aplicadas, no se encontraron diferencias

entre los índices de multiplicación obtenidos para la inducción de brotes en microcormos de *Musa* AAA cv.

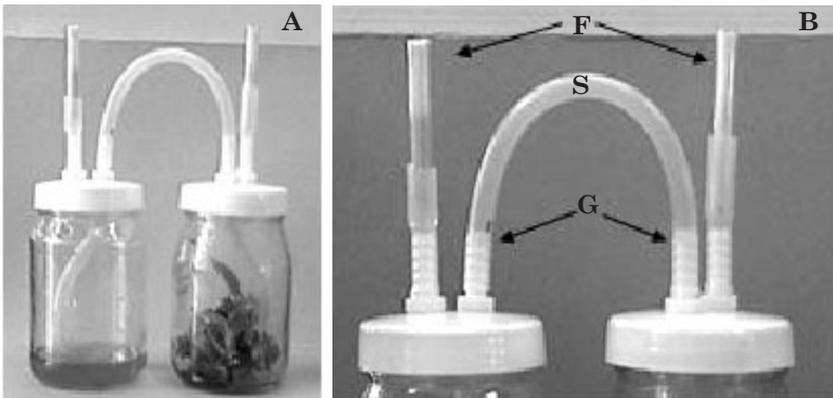


Figura 1. Recipientes prototipos construidos en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (BioVeLUZ) para la inmersión temporal (A). B: Detalle de las conexiones, F: filtros de goma espuma, S: manguera de silicona autoclavable, G: Guarniciones de plástico autoclavable.

Williams en los recipientes RITA (6,6 brotes/explante) o los obtenidos en los prototipos (5,8 brotes/explante) (figura 2). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Alvard y Teisson (3) quienes usaron una unidad para filtración Nalgene adaptada con recipiente de inmersión temporal. Además, con los filtros de goma espuma se logró la esterilización del aire en el 100% de los recipientes ensayados tanto RITA como prototipos, dado a que no hubo contaminación de los cultivos.

Para Junio del año 2004, el costo del prototipo de dos envases es de 30 dólares mientras que el costo de un recipiente RITA incluyendo los gastos de transporte e importación es de 120 dólares, aproximadamente. Adicionalmente, los filtros comerciales que solo resisten 10 ciclos de auto-

clave, tienen un costo aproximado de 5 dólares cada uno, mientras que los filtros elaborados con goma espuma resisten al menos 15 ciclos de auto-clave y su costo es menor de 6 centavos de dólar.

Otros prototipos de dos envases han sido desarrollados con insumos de laboratorio como fiolas, tapones horadados, mangueras de silicona, pero estos envases son difíciles de manipular debido a que su cuello es bastante estrecho y luego de 30 días de cultivo se dificulta extraer los explantes (2). Otro diseño interesante son los envases de 5 L o más para almacenar agua destilada NALGENE, transparentes y autoclavables, los cuales se han utilizado como recipientes para inmersión temporal para producción de tubérculos (6). El problema con estos recipientes es su gran tamaño, debi-

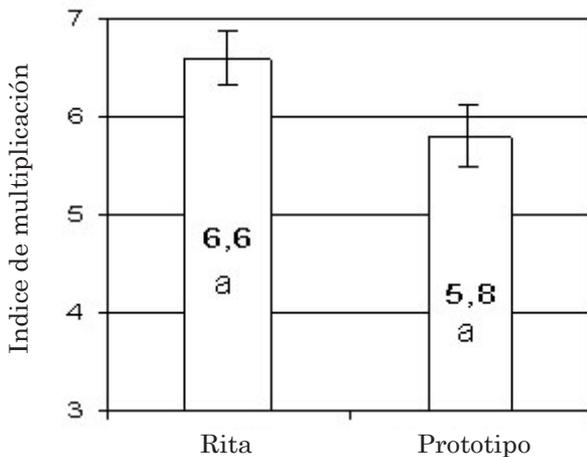


Figura 2. Evaluación del índice de multiplicación de *Musa* AAA cv. Williams, cultivados en sistemas prototipos para la inmersión temporal y los RITA. I.M ± ES (n=30). No hay diferencias significativas según prueba no paramétrica Kruskal-Wallis: $H(1, N=60) = 1,233067$ $p = 0,2668$, ni la prueba paramétrica de Tukey (HSD), $p = 0,01$.

do a que para ciertas aplicaciones como la inducción de brotes en *Musa* se deben utilizar inhibidores del crecimiento debido a que los explantes desarrollan mucho material vegetativo y se pierde potencial de multiplicación (2).

Por otra parte, a pesar de que los recipientes RITA tienen un diseño de un solo envase, su costo de compra y mantenimiento son muy elevados debido a los 10 componentes que pueden deteriorarse con el uso, lo que equivale a un costo de mantenimiento mínimo de 25 dólares por envase solo considerando las partes de silicona y goma espuma que sirve de

soporte a los explantes se deterioran con los ciclos de autoclave durante un año. Además, la rosca del envase con los ciclos de autoclavado se va deformando, lo que dificulta la manipulación de los explantes y aumenta su potencial contaminación. El prototipo propuesto en este trabajo, asciende a 1/4 del valor del recipiente RITA, las roscas no se deforman, solo requiere de dos empaaduras que se pueden comprar en el mercado nacional y muestra la misma eficiencia en el índice de multiplicación para esta prueba de inducción de brotes en *Musa acuminata* cv. Williams (AAA).

Conclusiones

Como resultado de esta investigación se logró un prototipo construido con insumos nacionales e importados con el cual se logran los mismos índices de multiplicación que los recipientes comerciales RITA, usando como modelo, microcormos de *Musa acuminata* cv Williams (AAA).

El recipiente prototipo cuesta un cuarto del costo del recipiente RITA.

Los filtros de goma espuma permiten esterilizar el aire que entra tanto a los recipientes RITA como a los prototipos, además son más económicos y duraderos.

Agradecimiento

Este trabajo fue cofinanciado por el Concejo de Desarrollo Científico y

Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) Proyecto No. 65-04.

Literatura citada

1. Aitken-Christie, J. y H.E. Davies. 1988. Development of semi-automated propagation system. Acta Hort. 230:81-87.
2. Albany, N. 2001. Efectos de los retardantes de crecimiento en la micropropagación de bananos en medios de cultivos líquidos en agitador orbital y sistema de inmersión temporal. Tesis de Maestría. Universidad Central de la Marta de Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba. 80 p.
3. Alvard, D.F. y C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium for banana micropropagation. Plant Cell, Tiss and Org Cult. 32: 55-56.

4. Colmenares, M. y C. Giménez. 2001. New strategies for shoot induction in *Musa*. IV Latin-American meeting on plant Biotechnology REDBIO 2001. 4 al 8 de Junio de 2001. Goiania-Goiás, Brasil.
5. Debergh, P. 1988. Improving mass propagation of in vitro plantlets p :45-57. En: Kozait: (Ed.). Horticulture in High Techonology era Inter-national Symposium on High Tecnology in Protected Cultivation.
6. Jiménez, E., A. Capote, N. Pérez, E. Quiala, M. de Feria, R. Barbon y J.C. Pérez 1997. Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en sistema de inmersión temporal. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. 97. p.7.
7. Pérez Ponce, J.N., G.A. Jiménez y P.D. Agramonte. 1998. Aumento de la Eficiencia en la Micro-propagación. p. 179-191. En: Pérez Ponce, J.N (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Ediciones GEO: Vol. 1. Instituto de Biotecnología de Plantas (IBP). Santa Clara, Cuba.
8. StatSoft, Inc. 1999. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 7492217, email: info@statsoft.com, WEB: http://www.statsoft.com.
9. Teisson, C. 1997. RITA an apparatus for application of temporary immersions in plant tissues culture. Resúmenes: Técnicas avanzadas en la propagación masiva de plantas. BIOVEG'97. p.32.
10. Teisson, C., D. Alvard, B. Berthouly, T. Cote, J. Escalant, H. Etienne y M. Lartaud. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by immersion. Acta Hort. 440:521-526.