

Desarrollo de yemas adventicias en banano (*Musa sp.*) cv. Gran Enano (AAA)

Lourdes García*, Juan Pérez Ponce, Idalmis Bermúdez, Pedro Orellana, Novisel Veitía, Leonardo García, Yeny Padrón, Carlos Romero * Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5¹/₂, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: lougarcia@uclv.edu.cu

RESUMEN

Con el objetivo de inducir de forma acelerada yemas adventicias en el cultivar Gran Enano se estudiaron varias citoquininas en el medio de cultivo. Los mayores valores de explantes con desarrollo de yemas adventicias se obtuvieron cuando se utilizó el Thidiazuron (TDZ) en los medios de cultivo, encontrándose en solo dos subcultivos 62-83% de explantes con desarrollo de estas estructuras. La utilización de estas estructuras podría ser una alternativa muy útil en los programas de Mejoramiento Genético y Micropropagación de plantas.

Palabras clave: cultivo de tejidos, histología, organogénesis, thidiazuron

ABSTRACT

Several cytokinins were studied in the culture media with the aim of induction of adventitious buds in the cv. 'Gran Naine'. The largest explant values with development of adventitious buds were obtained when Thidiazuron (TDZ) was used in the culture medium, with only two sub-cultures needed to develop 62-83% explant with these structures. The use of this explants could be a very useful alternative in genetic improvement programs and plant micropropagation.

Key words: cell culture, histology, organogenesis, thidiazuron

INTRODUCCIÓN

En los programas de mejoramiento genético es importante contar con un sistema de regeneración de plantas eficiente, que permita que las células modificadas genéticamente puedan desarrollarse y regenerar plantas que manifiesten las características deseadas. Es por ello que en la mayoría de estos programas se utilizan estructuras multicelulares las cuales traen consigo, la aparición de quimeras que es una gran limitante (Ahloowalia, 1998). Siendo por esta razón muy importante la búsqueda de explantes que se formen a partir de una o pocas células como los embriones somáticos (Lee *et al.*, 1997) y yemas adventicias (Vuylsteke *et al.*, 1997). En el cultivar Gran Enano es muy difícil la obtención de yemas adventicias debido a la alta dominancia apical (INIBAP, 1996).

El objetivo de este estudio fue desarrollar un medio de cultivo que permitiera obtener en pocos subcultivos estas estructuras en el cultivar Gran Enano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material de partida se utilizaron ápices del cultivar Gran Enano (AAA), que fueron establecidos *in vitro* de acuerdo CON la metodología propuesta por Orellana (1994).

Los brotes fueron colocados en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 20 g.l⁻¹ de sacarosa, 1.3 mg.l⁻¹ de Ácido indol-3-acético (AIA), y algunas concentraciones de citoquininas como se muestra a continuación: N₆ – bencilaminopurina (6BAP) (5.0-10-20) ó Kinetina (1.0-5.0-10) ó isopenilaminopurina (Zip) (1.0-5.0-10) ó TDZ (1.0-5.0-10). El medio de cultivo fue solidificado con 7 g.l⁻¹ de agar (Type A, Sigma). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.8 antes de autoclavar a 121°C durante 20 min. Se evaluó el número de explantes que formaron yemas adventicias y el número de brotes por frasco.

Estudios histológicos de la brotación y la formación de yemas adventicias

Para el proceso de microtécnica el material se fijó en una solución de FAA que contenía formaldehído, ácido acético glacial y alcohol etílico al 70% en una relación 1:1:18, durante un tiempo de 24 horas. La deshidratación progresiva de las muestras se realizó en soluciones de alcohol de graduación creciente comenzando con el alcohol de 70° hasta llegar al alcohol etílico absoluto y la inclusión se realizó en bloques de parafina. Los cortes se realizaron a 10 µm con un micrótopo rotatorio Heidelberg HM 320 y posteriormente se tiñeron según el método de tinción doble con hematoxilina (1.0%)-eosina (2.0%)-Fast green (1.0%).

Los datos fueron procesados a través de una prueba de comparación de medias ANOVA usando el paquete estadístico SPSS/PC ver 9.00 para Windows. En algunos datos se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, complementándose con una comparación múltiple no paramétrica de medias de rango, empleándose el paquete de programas STATISTIX ver. 1.0 sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando los explantes provenientes del medio de cultivo de establecimiento fueron colocados en los medios de cultivo para la formación de yemas

adventicias, se encontraron diferencias en el desarrollo proliferativo Con la Kinetina y el 2ip. No se logró la inducción de yemas adventicias. La citoquinina que tuvo mayor influencia en la inducción de estas yemas fue el TDZ, obteniéndose mayor desarrollo de estas estructuras en todas las concentraciones ensayadas cuando se compara con el efecto de provocó el 6BAP (Tabla 1). En especies leñosas se han utilizado diferentes concentraciones de TDZ para el desarrollo de yemas adventicias (Huetteman y Preece, 1993). No se tienen referencias de la utilización de esta citoquinina para la obtención de yemas adventicias en el cv. 'Gran Enano'.

Tabla 1. Influencia del 6BAP y el TDZ en el número de explantes con desarrollo de yemas adventicias y el número de brotes totales por frasco en el cv. 'Gran Enano' en el segundo subcultivo.

Citoquininas-conc. (mg.l ⁻¹)	No. explantes con yemas adventicias	No. brotes formados por frasco
	Medias	Medias de rango*
6BAP – 5.0	0.50	14.3 b
6BAP - 10	1.40	22.4 b
6BAP - 20	0.10	10.2 b
TDZ – 1.0 (M1)	7.20	33.5 a
TDZ – 5.0	45.2 a	14.8 c
TDZ – 10	41.7 a	11.1 d
TDZ – 10	49.3 a	6.9 e
EE		±0.82

* Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por DUNCAN o Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis* para $p < 0,05$.

El comportamiento del cv. Gran Enano se debe a la alta dominancia apical que presenta (INIBAP, 1996), lo que condujo a que el TDZ al ser más activo a bajas concentraciones que la citoquininas

aminopurinas y ser menos susceptible a las enzimas degradantes presentes en las plantas (Mok *et al.*, 1987), permitió el desarrollo de estas estructuras (Figura 1).

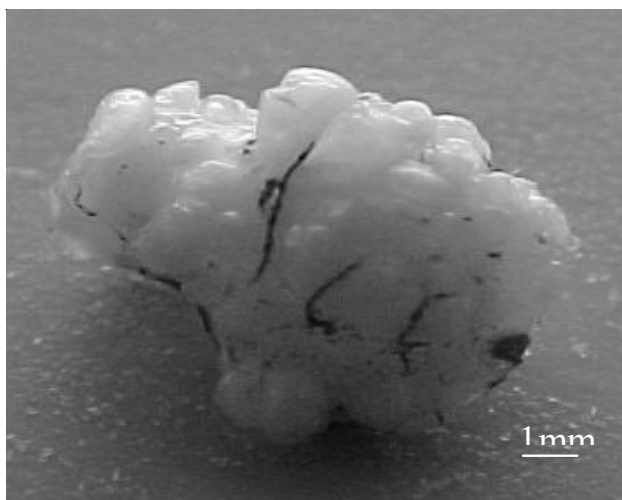


Figura 1. Desarrollo de las yemas adventicias en los medios de cultivo con TDZ en el cv. Gran Enano.

Los cultivares (AAA) requieren hasta nueve subcultivos en el medio de cultivo antes de que la dominancia apical se elimine (INIBAP, 1996).

En este trabajo, con la utilización del TDZ, en solo dos subcultivos se logró en los explantes el desarrollo de yemas adventicias en la superficie

del mismo. Con el conocimiento de que el TDZ puede influir negativamente en la elongación y el enraizamiento de los brotes (Huetteman y Preece, 1993), se seleccionó la dosis de 1.0 mg.l⁻¹ para utilizarla en los medios de inducción de yemas adventicias por ser la menor dosis ensayada y no presentar diferencias significativas con las restantes concentraciones.

Estudios histológicos de la brotación y la formación de yemas adventicias

En las muestras tomadas desde los pequeños

brotes en formación se observaron yemas donde se destacó la conexión de las mismas con el explante primario, estas emergen directamente desde la axila de la hoja confirmando el origen axilar de los mismos. Se observó en estos explantes la zona meristemática con los primordios de hojas (Figura 2a). En las muestras obtenidas desde las pequeñas yemas adventicias se observó en la superficie del tejido, pequeñas ondulaciones que eran evidencia de la formación de nuevas yemas, confirmando el origen adventicio de estas estructuras (Figura 2b).

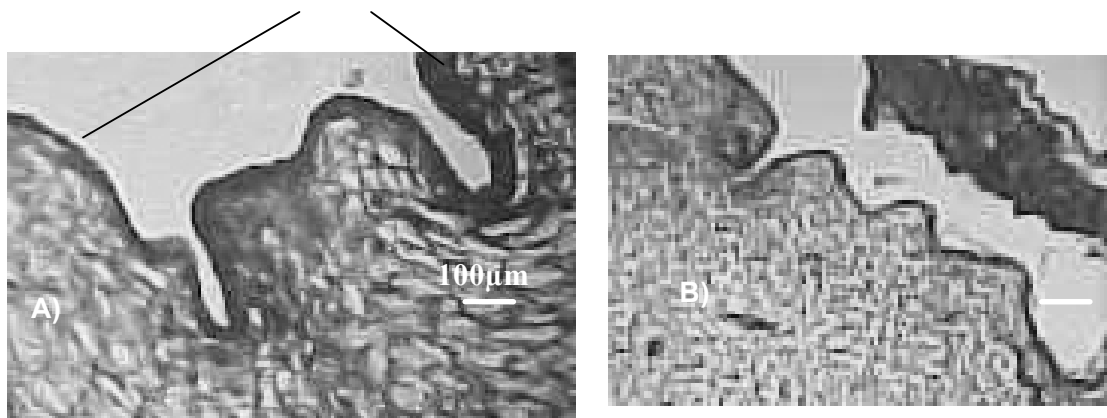


Figura 2. Estudios histológicos realizados a los explantes del cv. Gran Enano desarrollándose en el medio de cultivo (M1). A- Sección longitudinal a través de un pequeño brote en formación (1) meristemo (2) primordios de hojas B- Desarrollo de ondulaciones (l) en la superficie meristemática del explante mostrando la formación de las yemas adventicias.

En estudios realizados por Banerjee *et al.* (1986), Novak *et al.* (1990) se demostró el origen adventicio de nuevos brotes influyendo en esta formación la presencia de citoquininas en el medio de cultivo y el genoma utilizado.

CONCLUSIONES

Para la inducción de yemas adventicias, el TDZ fue significativamente superior a todas las citoquininas ensayadas. Se obtuvo de 62 a 83% de explantes con desarrollo de estas estructuras, en solo dos subcultivos, en dependencia de la concentración utilizada.

REFERENCIAS

Ahloowalia BS (1998) *In vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. En: Jain MS, Brar DS y Ahloowalia BS (eds.) Somaclonal variation and Induced Mutations crop improvement (pp. 293-309). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Banerjee N, Vuylsteke D y De Langhe EAL (1986) Meristem tip culture of *Musa*: histomorphological studies of shoot bud proliferation. En: L.A. Withers y P.G. Alderson (eds). Plant Tissue

Culture and its Agricultural Applications (pp 359-370). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Huetteman CA y Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 105-119

INIBAP (1996) *Musa* Germoplasm Management. Annual Report (p 54). Networking Banana and Plantain. Montpellier. France

Lee KS, Zapata-Arias FJ, Brunner H y Afza R., 1997. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 1-8

Mok MC, Mok DWS, Turner JE y Mujer CV (1987) Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. HortScience 22: 1194-1196

Murashige, T. y Skoog R. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15:473-493

Novak FJ, Afza R, Van Duren M y Omar MS (1990) Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (*Musa* cvs.) Tropical Agriculture 67: 21-28

Orellana PP (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis en opción del Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas (p 120). Cuba

Vuylsteke D, Ortiz R, Ferris S y Crouch J (1997) Plantain improvement. Plant Breeding Rev 14: 267