

Manejo de hijos y ápices de cultivares de *Musa* spp. para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis subcultivos *in vitro*

Pedro Orellana Pérez, Lourdes García, Idalmis Bermúdez, Novisel Veitia y 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.

RESUMEN

Se evaluaron dos formas de manejo de los hijos de donde para extraer los ápices que se implantaron *in vitro*. Se encontró que el método de plantar los pequeños cormos en los Canteros Tecnificados (CT), para provocar el rebrote de la yema apical y su desarrollo sobre un suelo desinfectado, favoreció la supervivencia *in vitro*, redujo notablemente el número de ápices contaminados y el tiempo requerido para su establecimiento con respecto a la implantación directamente con material de campo. Cuando se implantaron ápices completos resultó ser donde mayor número de estos lograron establecerse (78%), a la vez que alcanzaron el mejor desarrollo y coloración verde. Los cultivares más estables en la multiplicación durante el inicio del proceso de la micropropagación fueron el banano híbrido 'FHIA 01' y el plátano híbrido 'FHIA 20', sin embargo, este último presentó el menor coeficiente de multiplicación entre todos los cultivares por lo cual produjo la menor cantidad de brotes acumulados en seis subcultivos. El mayor coeficiente de multiplicación fue alcanzado por el banano híbrido 'FHIA 23', el cual produjo el mayor número de brotes acumulados aun presentando una notable variabilidad entre subcultivos (CV = 39,9%). Los cultivares de banano no presentaron diferencias entre sí, y su coeficiente de multiplicación fue mayor que para todos los cultivares de plátano, con excepción de 'FHIA 04'.

Palabras clave: coeficiente, fenolización, híbridos, manejo *in vitro*, plátanos

ABSTRAC

Two forms of handling of the tillers were evaluated to extract the apexes that will be established *in vitro*. One was the method of the planting the rhizomes which below to the small tiller in the concrete beds, to cause the sprout again of the apical bud and its development on a disinfected ground, favored the survival *in vitro*, remarkably reduced to the number of contaminated apexes and the time required for his establishment with respect to the implantation directly with field material. When complete apexes were implanted was being where greater number of these (78%) were establish, simultaneously that reached the best development and green coloration. You will cultivate them more stable in the multiplication during the beginning of the process of the micropropagation were the hybrid of banana 'FHIA 01' and the hybrid of plantain 'FHIA 20', nevertheless, this last one presented the smaller coefficient of multiplication between all you will cultivate them, thus produced the smaller amount of accumulated buds in six subcultures. The greater coefficient of multiplication was reached with the hybrid banana 'FHIA 23', which produced greater numbers of new buds that appear accumulated, nevertheless, 39.9% presented a remarkable variability coefficient (VC) between subcultures. The banana cultivars did not present differences to each other, and its coefficient of multiplication was greater than the plantain cultivars, excepting the plantain hybrid 'FHIA 04'.

Key words: plantain, hybrids, *in vitro* management, phenolization, coefficient

INTRODUCCIÓN

En la micropropagación de plátanos y bananos intervienen varios factores que deben ser optimizados a fin de lograr los mejores resultados en las diferentes fases de la micropropagación, pero especialmente en las fases I (Establecimiento) y II (Multiplicación).

La respuesta genotípica se conoce que influye en los rangos y tipo de proliferación (Vuylsteke y de Langhe, 1985), sin embargo, la composición del medio de cultivo, especialmente las dosis de citoquininas, el estado fisiológico y sanitario de la planta madre, así como el tamaño, edad y momento de toma de los hijos que se utilizaran para la implantación de los ápices, se ha visto en la práctica

que tienen gran influencia en todo el proceso inicial y durante la micropropagación *in vitro* de cultivares de esta especie.

Jarret *et al.* (1994), encontraron diferentes rangos de proliferación si los explantes originales establecidos *in vitro*, provienen desde la planta madre o de los brotes laterales (hijos o nietos).

En este trabajo se estudia la respuesta al manejo de los hijos primarios, previo a su implantación *in vitro*, la forma de corte del ápice para el iniciar el proceso de la multiplicación y la respuesta de cada ápice individual durante los primeros subcultivos en varios cultivares de bananos con vistas a mejorar las etapas iniciales de la micropropagación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la influencia del manejo de los hijos previo al proceso de implantación *in vitro*, se seleccionaron 100 hijos tipo “espada” de 30 a 50 cm de altura en plantas madres previamente caracterizadas en el banano ‘Gran Enano’ (AAA) y en el banano de cocción ‘Pelipita’ (ABB). De cada cultivar, 50 hijos fueron plantados en un cantero tecnificado (CT) sobre suelo desinfectado después de haberse decapitado, mondado y lavado con agua corriente para eliminar restos de suelo adherido al cormo, denominándose Grupo I. Otros 50 hijos de cada cultivar (Grupo II), fueron procesados para su implantación directa *in vitro*. Se siguió el procedimiento de eliminar las cubiertas de vainas y parte exterior del cormo hasta dejar un ápice de 20 mm de diámetro en el cormo y 25 mm de altura. Después de tres lavados con agua corriente y detergente, estos fueron sometidos a una primera desinfección durante 20 minutos en una solución al de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) que contenía 3% de cloro activo, después de lo cual, se realizó un mondado hasta 15 y 30 mm de diámetro y altura, respectivamente. Se procedió a una segunda desinfección con una solución igual a la anterior preparada con agua estéril, pero manipulada en una Cabina de Flujo Laminar con igual tiempo de desinfección. El último mondado previo a la implantación *in vitro* se realizó en la mesa de la Cabina de Flujo Laminar hasta dejar un ápice de 8 mm de ancho en su base y 10 mm de altura donde estaba contenido el meristemo apical. Cada ápice fue implantado en un tubo de cultivo de 210 mm de largo por 20 mm de diámetro que contenía 10 ml del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) en estado líquido, suplementado con 2 mg.l⁻¹ de 6-Bencil Amino Purina (6-BAP) y 0.123 mg.l⁻¹ de Acido Indol Butírico (AIB). Para impedir la inmersión total del ápice en el medio de cultivo este se colocó sobre un soporte de papel de filtro en forma de una M. El subcultivo de establecimiento y los posteriores se desarrollaron bajo condiciones de iluminación con luz solar en cámaras de cultivo, con una densidad de flujo de fotones que osciló entre 48,0-62,5 μ mol. m⁻². s⁻¹, con un fotoperíodo de 14 horas y la temperatura de 27±2°C. Igual procedimiento se siguió con los 50 hijos plantados en canteros tecnificados después de crecer en los mismos durante 45 días.

Después de implantados *in vitro*, al concluir el subcultivo de establecimiento, se evaluaron las siguientes variables en ambos grupos de ápices:

- % de explantes muertos, contaminados y vivos (con crecimiento normal).
- Número de días requeridos para el establecimiento.
- Coloración adquirida por explante (pardo, blanco o verde)
- Tamaño del explante (mm).

- Grado de Fenolización (tenue, ligera o fuerte).
- Desarrollo del explante (lento, rápido).

En otro experimento, se evaluaron tres formas de preparar el ápice para su implantación *in vitro*. Una variante fue decapitar el ápice 2-3 mm sobre el microcormo, en la segunda se decapitó de igual manera y se dividió en forma longitudinal en la base del microcormo, mientras que la tercera consistió en dejar el ápice con un microcormo de un diámetro de 5 mm y altura de 8 mm. Se evaluaron 30 ápices en cada variante, los cuales provenían del banano ‘Gran Enano’ de hijos tipo espada previamente establecido en CT. El procedimiento para desinfección, medios de cultivo y condiciones de cultivo *in vitro* fueron las mismas citadas en el párrafo precedente. Se evaluó para cada variante el número de ápices establecidos con crecimiento normal, número de ápices contaminados y muertos. Adicionalmente se evaluó el aspecto cualitativo con base a la coloración adquirida por los ápices (pardo, blanco o verde).

Para conocer el efecto del genotipo con diferente genoma y dentro de ellos, la respuesta de cada ápice individual durante las etapas iniciales de la multiplicación *in vitro* (subcultivos del uno al seis), se utilizaron 20 hijos tipo “espada” de los cultivares de banano: ‘Gran Enano’ (AAA), ‘FHIA 01’ (AAAB), ‘FHIA 02’ (AAAA), ‘FHIA 03’ (AABB), y ‘FHIA 23’. En plátanos se incluyeron en el estudio los híbridos: ‘FHIA 04’, ‘FHIA 19’, ‘FHIA 20’, ‘FHIA 21’ y ‘FHIA 22’. El procedimiento para su manejo previo a la implantación, desinfección e implantación *in vitro* fue el descrito anteriormente. El medio de cultivo utilizado para la Fase de multiplicación fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) en estado semisólido, suplementado con 4 mg.l⁻¹ de 6-BA, 1,3 mg.l⁻¹ de Acido Indol Acético (AIA), 3% de Sacarosa y 100 mg.l⁻¹ de Mioinositol. Las evaluaciones consistieron en determinar el coeficiente de multiplicación de cada ápice individual en cada subcultivo y el número de brotes totales acumulados hasta el sexto subcultivo.

Para el análisis estadístico se utilizó un Anova simple y la prueba de DUNCAN y la “T” de Students para las comparaciones de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Manejo de los hijos seleccionados para implantar ápices *in vitro*

Al comparar las dos formas de manejo de los hijos de donde se extrajeron los ápices que se implantaron *in vitro*, se encontró que el método de plantar los pequeños cormos en los Canteros Tecnificados (CT), para provocar el rebrote de la yema apical y su desarrollo sobre un suelo desinfectado, favoreció la supervivencia *in vitro*, redujo significativamente el

número de ápices contaminados y el tiempo requerido para su establecimiento *in vitro* (Tabla 1). Este proceder hace innecesario el subcultivo de limpieza de los ápices que se realiza al material que se establece directamente del campo. Por otra parte,

se encontró que en el material obtenido directamente del campo (Grupo I), siempre se produce la mortalidad de algunos ápices, mientras que no ocurrieron muertes en el material establecido desde los CT (Grupo II).

Tabla 1. Comparación de dos formas de manejo del material vegetal para implantar *in vitro* en los clones de banano de cocción 'Pelipita' (ABB) y el banano 'Gran Enano' (AAA).

Cultivar	Forma de manejo	Total de ápices implantados	% de ápices			Número de días para el establecimiento
			Contaminados	Vivos sanos	Muertos	
Pelipita	Grupo I	50	24 a	68 b	8	25.0 a
	Grupo II	49	8 b	92 a	0	10.4 b
Gran Enano	Grupo I	50	24 a	72 b	4	24.0 a
	Grupo II	50	6 b	94 a	0	12.2 b

Letras iguales no difieren significativamente para P = 99%. según la prueba de rangos múltiples de Duncan
Grupo I: Ápices establecidos directamente del campo.

Grupo II: Ápices establecidos después de 45 días en Canteros Tecnificados (CT).

Al analizar cualitativamente algunos aspectos de ambas formas de manejo, se observó (Tabla 2) que en la utilización de hijos directamente de campo (Grupo I), se produjo el mayor porcentaje de fenolización, menor crecimiento y muchos ápices no llegan a presentar el color verde característico, así mismo el crecimiento y desarrollo en esta etapa fue lento. Al comparar de forma

integral el comportamiento de los ápices en ambos procedimientos es evidente que la germinación de las yemas en CT previo a establecimiento *in vitro*, presenta grandes ventajas respecto al sistema tradicional de implantar material directamente de campo. El comportamiento para ambos cultivares en las variables evaluadas fue muy similar.

Tabla 2. Evaluación, cuantitativa y cualitativa de dos formas de manejo de los ápices para implantar *in vitro* en los cultivares de cocción 'Pelipita' (ABB) y el banano 'Gran Enano' (AAA).

Cultivar	Forma de manejo	% de ápices con										Desarrollo
		Coloración			Tamaño (mm)			Fenolización				
		P	B	V	< 5	5-10	>10	T	L	F		
Pelipita	Grupo I	40	10	50	40	30	30	10	20	70	Lento	
	Grupo II	25	0	75	0	50	50	60	28	12	Rápido	
Gran Enano	Grupo I	30	30	40	32	40	28	20	24	56	Lento	
	Grupo II	10	14	76	10	20	70	70	22	8	Rápido	

P = Pardo, B= Blanco, V = Verde; T= Tenue, L = Ligera, F = Fuerte

Grupo I: Ápices establecidos directamente del campo.

Grupo II: Ápices establecidos después de 45 días en Canteros Tecnificados (CT).

Desde el punto de vista práctico, realmente el período de tiempo desde la selección en campo hasta el establecimiento *in vitro* fue mayor cuando los pequeños cormos se hicieron germinar en los CT, sin embargo, el mayor número de ápices implantados y la calidad de los mismos, permitieron recomendar este procedimiento.

En plátanos y bananos no se ha referido información sobre este tipo de manejo, pero ha sido empleado con éxito en otras especies (Hu y Wang, 1983), fundamentalmente para reducir los problemas de la contaminación microbiana con notable éxito.

Formas de preparación del ápice para su establecimiento *in vitro*

Al compararse las tres formas de preparación del ápice una vez concluido el proceso de desinfección, se encontró que aquella en que se utilizaron los ápices completos resultó ser donde mayor número de estos lograron establecerse (78%), a la vez que alcanzaron el mejor desarrollo y coloración verde (Tabla 3). Los ápices a los cuales se les cortó la parte superior de primordios de hojas que cubren el meristemo lograron un 64% de establecimiento, sin embargo, el desarrollo fue inferior y un menor

número alcanzaron la coloración verde. En los ápices seccionados en su base, sólo el 47% logró establecerse *in vitro*, presentando los mayores porcentajes de contaminación microbiana, probablemente debido a que el efecto del corte favoreció la contaminación del medio de cultivo con bacterias endógenas. Este resultado resultó de gran interés, pues aunque el número de ápices establecidos fue inferior, se presentó menos riesgo de perder gran parte del material cuando estas bacterias se desarrollaran a partir de los cortes en el microcormo en los subcultivos posteriores,

donde ya los brotes de cada ápice se han incrementado y muchos se han mezclado en diferentes frascos de cultivo. Pérez y Reyes (1987), refirieron una mayor ganancia en el total de vitroplantas producidas desde un ápice empleando esta última forma de manejo para el establecimiento *in vitro* del mismo cultivar 'Gran Enano'. Jiménez (1998) ha indicado la especial atención que debe prestarse en el caso de las plantas propagadas asexualmente en cuanto al tamaño y tipo de material de siembra, así como al manejo del mismo.

Tabla 3. Efecto de diferentes formas de preparación de los ápices para su establecimiento *in vitro* en el cultivar 'Gran Enano'

Desarrollo del ápice	Ápice decapitado				Ápice seccionado				Ápice completo			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
Entre 3 y 5 mm	14	7	2	5	10	10	0	0	2	2	0	0
Entre 6 y 10 mm	8	0	1	7	13	4	2	7	5	0	1	4
Mayores de 10 mm	8	0	1	7	7	0	0	7	23	0	4	19
Totales	30	7	4	19	30	14	2	14	30	2	5	23
(%)	100	23	13	64	100	47	6	47	100	6	16	78
Coloración del ápice												
Pardo	5	4	1	0	8	8	0	0	3	2	1	0
Blanco	14	3	3	8	19	6	12	11	7	2	0	5
Verde	11	0	0	11	3	0	0	3	20	0	2	18
Totales	30	7	4	19	30	14	2	14	30	4	3	23
(%)	100	23	13	64	100	47	6	47	100	6	17	77

a = Total de ápices, b = ápices contaminados, c = ápices muertos y d = Ápices establecidos

Influencia del genotipo y el número de subcultivos en el coeficiente de multiplicación

Los cultivares más estables durante el inicio del proceso de la micropropagación fueron el banano híbrido 'FHIA 01' y el plátano híbrido 'FHIA 20', sin embargo, este último presentó el menor coeficiente de multiplicación entre todos los cultivares, por lo cual produjo la menor cantidad de brotes acumulados en seis subcultivos (Tabla 4). Ramírez (1995) encontró un comportamiento similar para el banano 'FHIA 01'. El mayor coeficiente de multiplicación fue alcanzado por el banano híbrido 'FHIA 23', el cual produjo el mayor número de brotes acumulados, no obstante presentar una notable variabilidad entre subcultivos (CV = 39,9%). Con la excepción del híbrido de plátano 'FHIA 04', todos los cultivares de plátano presentaron el más bajo coeficiente de multiplicación, destacándose entre ellos el 'FHIA 20' con el menor valor. Los cultivares de banano no presentaron diferencias entre sí, y su coeficiente de multiplicación fue mayor que en los cultivares híbridos de plátano, con excepción del híbrido 'FHIA 04'.

Sandoval *et al.* (1991) al realizar un trabajo similar con los cultivares 'Curare' (AAB), 'Dominico' (AAB), 'Gran Enano' (AAA) y "Valery" (AAB), durante cinco subcultivos consecutivos, encontraron variación en el coeficiente de multiplicación entre genotipos y entre plantas dentro de cada genotipo.

Las diferencias en la multiplicación *in vitro* están ligadas a la configuración genómica de los cultivares, especialmente en los diploides y triploides. La presencia de uno o dos genomas B en los cultivares triploides se correlaciona con la mayor tasa de proliferación y no parece estar relacionado con la dominancia apical (Vuylsteke y de Langhe, 1985). En estudios realizados por Banerjee *et al.* (1986) claras diferencias fueron observadas entre los triploides AAA ('Cavendish enano', 'Pisang nangka') y los cultivares AAB ('Silk, Prata') y ABB ('Bluggoe') en el tipo de crecimiento proliferativo. En el caso de los híbridos tetraploides de plátano, la presencia de un genoma B no influyó de forma positiva para la expresión de este carácter en los cultivares 'FHIA 19', 'FHIA 20', 'FHIA 21' y 'FHIA 22', pero quedó evidente su influencia en el resto de los genotipos de plátano y bananos según los resultados de este trabajo (Tabla 4).

Tabla 4. Comportamiento del coeficiente de multiplicación (C.M) de cultivares de *Musa* spp. durante seis subcultivos.

Cultivares	Valor medio del C.M. por Subcultivo					IV	Valor Medio del C.M.	Total de brotes (*)	C.V: (%)
	I	II	III	IV	V				
FHIA 01	1.66	2.41	2.51	2.54	2.50	2.21	2.31 abcd	704	11.45
FHIA 02	2.00	1.25	3.20	3.55	1.76	1.99	2.29 abcd	475	38.86
FHIA 03	1.00	2.60	3.65	3.10	3.80	3.28	2.91 ab	1834	35.24
FHIA 04	1.50	1.67	3.60	1.94	2.34	2.48	2.26 bc	508	33.94
FHIA 19	2.00	2.00	2.75	1.67	1.81	1.73	1.99 cd	288	24.57
FHIA 20	1.75	1.71	2.00	1.71	1.66	1.63	1.74 d	139	17.43
FHIA 21	2.00	2.25	3.17	1.28	1.30	2.10	2.02 cd	249	34.51
FHIA 22	2.00	2.00	3.00	1.40	1.27	1.81	1.91 cd	193	32.09
FHIA 23	2.00	2.20	5.20	3.92	2.68	2.68	3.11 a	3221	39.90
G. Enano	2.00	2.20	2.56	3.30	2.95	3.00	2.67 abc	1645	18.88

(*): Total de brotes acumulados en seis subcultivos desde cinco ápices.

C. V. = Coeficiente de variación.

Letras iguales en la misma columna no difieren para P = 0.05 según la prueba de rangos múltiples de Duncan

Daniels (1999) cuando estudió el comportamiento en la multiplicación *in vitro* del cultivar 'FHIA 21' encontró coeficientes de multiplicación estables en los diferentes subcultivos, pero con valores inferiores a 2.5.

CONCLUSIONES

La cantidad y calidad de los ápices que se establecieron *in vitro* en cultivares de bananos fue mayor cuando previo al establecimiento los hijos seleccionados se hicieron crecer independientemente de la planta madre en canteros tecnificados (CT) durante 45 días. En el momento del establecimiento *in vitro*, estos ápices no deben ser decapitados ni seccionados en su base.

Se presentaron notables diferencias para la estabilidad en la multiplicación *in vitro* entre cultivares de bananos y plátanos, encontrándose este factor relacionado con la complejidad genómica de los cultivares estudiados. Los más estables en el coeficiente de multiplicación durante los primeros subcultivos fueron el banano 'FHIA 01' y el plátano 'FHIA 20'.

REFERENCIAS

Daniels D D (1999). Micropropagación del Clon de Plátano, Híbrido FHIA-21 (AAAB) y sus somaclones. Tesis en opción

del Grado Académico de Maestro en Ciencia en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Cuba. P. 64

Banerjee N, Vuylsteke D y De Langhe E A L (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. Kluwer Academic Publishers. pp. 359-370. Dordrecht

Hu C y Wang P J (1983). Meristem Shoot tip and bud culture. En: Evans, D A (Ed.), Handbook of Plant Cell Culture techniques for propagation and breeding. MacMillan. New York pp. 177-277

Jiménez E, (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez, J P (Ed.). Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Cuba. Editora GEO. pp.45-56. La Habana

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

Orellana, PA (1995) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. IBP-Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

Pérez, J y Reyes, C G (1987). Trabajo de Diploma. Curso 1986-1987. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV. P. 40

Ramírez D A (1995) Estudio del comportamiento *in vitro* del clon de banano (*Musa* spp) FHIA 01 (AAAB). Tesis de Diploma. Universidad Central de Las Villas. Cuba. p. 52

Sandoval F J A y Muller L (1992) Influencia del tamaño de explante en la propagación *in vitro* de cuatro cultivares de *Musa*. TURRIALBA (CRI) 42 (21): 243-248

Vuylsteke, D y De Langhe, E A L (1985) Tropical Agriculture. Trinidad. 22: 49-57