

## Efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátanos y bananos

Silvio Martínez<sup>1,2</sup>, M. Fontes-Leandro<sup>3</sup>, O. Pérez-Espinosa<sup>3</sup>, M. Aday-Reyez<sup>3</sup>, L. García-Águila<sup>1</sup>, Y. Rodríguez Cruz<sup>3</sup>, A. Valdés-Moreno<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia

<sup>1</sup>Instituto de biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera Camajuaní km 5.5, Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: silvio@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Sede Universitaria Municipal Camajuaní. Joaquín Páneca 62. Camajuaní. Villa Clara. Cuba. e-mail: silvioid@uclv.edu.cu

<sup>3</sup>Biofábricas. MINAGRI. Carretera a Palmira km 1.5, Cienfuegos. Cuba.

### RESUMEN

La propagación de plátanos y bananos (*Musa* spp.) a través de técnicas biotecnológicas ha generado una gran demanda de las biofábricas, sin embargo es necesario optimizar este proceso de producción para hacerla más eficiente. El trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la multiplicación *in vitro* en tres cultivares de plátanos y bananos ('Grande naine', 'FHIA 18' y 'FHIA 21'). Como material vegetal fueron utilizados brotes laterales (1.0 cm de altura y 0.5 cm de diámetro del seudotallo), con dos subcultivos en medio de cultivo que contenía sales MS, 4.0 g l<sup>-1</sup> de agar, 0.65 mg l<sup>-1</sup> de AIA, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, así como 4.0, 4.0 y 3.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP para los cultivares 'Grande naine', 'FHIA-18' y 'FHIA-21', respectivamente. Se emplearon siete formas de corte y división de los brotes. Se logró con el empleo de un corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no dividir transversalmente el seudotallo, un incremento significativo del número de brotes por explante en todos los cultivares evaluados. Adicionalmente, con este proceder se lograron plantas de mayor altura, requeridas para ser transferidas a la fase de enraizamiento en medios de cultivo líquidos.

Palabras clave: domo apical, 'FHIA-18', 'FHIA-21', 'Grande naine', micro-cormo, seudotallo

### ABSTRACT

Propagation of bananas and plantains (*Musa* spp.) through biotechnological techniques has generated a great demand for biofactories. However, it is necessary to optimize the production process to make it more efficient. This work was carried out to determine the effect of the way of cutting and dividing shoots on the *in vitro* multiplication of three cultivars of bananas and plantains ('Grande naine', 'FHIA 18' and 'FHIA 21'). Side shoots (1.0 cm height and 0.5 cm diameter of pseudostem) were used as plant material. Two subcultures on medium containing MS salts, 4.0 g l<sup>-1</sup> agar, 0.65 mg l<sup>-1</sup> IAA, 30 g l<sup>-1</sup> sucrose, and 4.0, 4.0, 3.0 mg l<sup>-1</sup> 6-BAP for the cultivars 'Grande naine', 'FHIA-18' and 'FHIA-21', were carried out respectively. Seven forms of cutting and dividing shoots were evaluated. A significant increase in the number of shoots per explant, in all cultivars tested, was reached when a longitudinal section of micro-corm up to the apical dome and without dividing pseudostem was practiced. Additionally, plants required to be transferred to the rooting phase in liquid culture media were obtained by this procedure.

Key words: apical dome, 'FHIA-18', 'FHIA-21', 'Grande naine', micro-corm, pseudostem

### INTRODUCCIÓN

La producción de plátanos y bananos (*Musa* spp.) constituye una fuente importante para la alimentación a nivel mundial. La biotecnología aplicada a la agricultura consolida la producción de

semillas de alta calidad genética y fitosanitaria, mediante la aplicación del cultivo *in vitro* vía organogénesis directa, a partir de yemas axilares (Vasil, 1994).

En Cuba, desde mediados de la década de los años 80 del siglo pasado, se inició el

desarrollo del programa de biotecnología aplicada a la propagación *in vitro* de varias especies de plantas, fundamentalmente plátanos y bananos, el cual se ha consolidado con la creación de 16 biofábricas distribuidas en todo el país (Orellana, 2008).

Los plátanos y bananos constituyen las especies de mayor volumen de propagación en el país con producciones anuales de 15 a 20 millones de plantas *in vitro* (Borroto *et al.*, 2006). Este proceso a escala de producción en biofábricas presenta algunas limitantes que incrementan los costos de producción. El bajo coeficiente de multiplicación durante la fase de multiplicación es una de las más importantes y de mayor influencia en la eficiencia del proceso de producción de plantas *in vitro* de plátanos y bananos en las biofábricas, el cual puede estar condicionado por factores como los medios de cultivo y la forma de dividir y separar los brotes.

Dada la problemática anterior este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátanos y bananos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se emplearon brotes axilares de 1.0 cm de altura y 0.5 cm de diámetro del seudotallo, con dos subcultivos, de los cultivares 'Grande naine' (*Musa* AAA) 'FHIA 18' (*Musa* AAAB) y 'FHIA 21' (*Musa* AAAB).

Se nombrará como seudotallo a la zona de las hojas enrolladas desde la parte superior del micro-cormo de la planta *in vitro* hasta la zona de transición peciolo-vaina de la hoja más joven abierta (Sandoval, 1989).

Estos brotes para su multiplicación fueron transferidos a un medio de cultivo constituido por las sales propuestas por MS (Murashige y Skoog, 1962), 0.65 mg l<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 4.0 g l<sup>-1</sup> de agar y 6-bencilaminopurina (6-BAP): 4.0, 4.0 y 3.0 mg l<sup>-1</sup> para los cultivares 'Grande naine', 'FHIA-18' y 'FHIA-21', respectivamente. El pH fue ajustado a 5.8±1 con una solución de NaOH (0.1 N) y HCl (0.1N) previo la esterilización.

Se determinó el efecto de diferentes formas de cortar y dividir los brotes en los tres cultivares estudiados (Tabla 1).

Tabla 1. Formas de cortar y dividir los brotes utilizadas para la multiplicación *in vitro* de tres cultivares de *Musa* spp. ('Grande naine', 'FHIA-18' y 'FHIA-21').

TRATAMIENTOS	
I	Cortar el seudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y no dividir el seudotallo.
II	Cortar el seudotallo a 1.0 cm de altura (a partir de la base) y no dividir el seudotallo.
III	Corte transversal del seudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones
IV	Corte transversal del seudotallo a 1.0 cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones
V	Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, no cortar el seudotallo y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones
VI	Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no cortar el seudotallo.
VII	Separar los brotes, sin cortar ni dividir el seudotallo

Se inocularon 10 explantes por frasco de 250 ml de capacidad, que contenían 30 ml de medio de cultivo y se establecieron 10 repeticiones por cada tratamiento. El material vegetal durante seis subcultivos de multiplicación, fue incubado en cámaras de luz solar a  $15 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $28 \pm 2^\circ \text{C}$  y humedad relativa de 80%. Los subcultivos se efectuaron cada 21 días.

Al final de cada subcultivo se evaluaron las siguientes variables:

- Número de brotes por explante
- Altura de los brotes (cm)
- Número hojas por brote
- Número de brotes fuera de tipo
- Número de brotes muertos
- Número de brote mayores de 2.5 cm de altura

En el último subcultivo de multiplicación se cuantificó, además, el número de plantas transferidas a fase de enraizamiento (Fase III), en el medio de cultivo que contenía 70% de las

sales MS, AIA ( $1.3 \text{ mg l}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ), en estado líquido.

Fue utilizado un diseño experimental completamente aleatorizado y los resultados fueron procesados estadísticamente, mediante el paquete estadístico SPSS versión 13. Para la comparación de las medias se utilizó la prueba Tukey (0.05) con previa comprobación de la distribución normal y homogeneidad de varianzas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La forma de cortar y dividir los brotes en la fase de multiplicación, influyó sobre el número de brotes por explante.

Los tratamientos en los que se realizaba un corte longitudinal al centro del micro-cormo hasta el domo apical y sin cortar transversalmente el seudotallo (V y VII), incrementaron significativamente el número de brotes por explante en los tres cultivares, sin diferencias entre ellos (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la forma de corte y división de los brotes en la multiplicación *in vitro* de tres cultivares de *Musa* spp.

Tratamientos	No de brotes/ explante		
	'Grande naine'	'FHIA-I8'	'FHIA-21'
I	1.98 c	1.95 c	1.85 c
II	2.51 b	2.35 b	2.25 b
III	2.50 b	2.40 b	2.31 b
IV	2.51 b	2.35 b	2.25 b
V	2.80 a	2.80 a	2.71 a
VI	2.96 a	2.90 a	2.80 a
VII	2.50 b	2.55 b	2.49 b
CV %	9.87	8.5	7.9
ES	2.63±0.11	2.52±0.13	2.43±0.16

Medias con letras iguales en una misma columna no presentan diferencias significativas según la prueba Tukey  $p \leq 0.05\%$ . Los datos representan valores medios de número de brotes por explante en seis subcultivos.  $n=100$ . TRATAMIENTOS: I- Cortar el seudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y no dividir el seudotallo, II-Cortar el seudotallo a 1.0cm de altura (a partir de la base) y no dividir, III-Corte transversal del seudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, -IV Corte transversal del seudotallo a 1.0cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, V-Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, no cortar el seudotallo y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, VI- Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no cortar transversalmente el seudotallo, VII-Separar los brotes, sin cortar ni dividir el seudotallo.

En ninguno de los tratamientos evaluados se observó mortalidad de los explantes, ni brotes fuera de tipo.

La tendencia al crecimiento en forma de roseta no se presentó cuando se utilizaron los tratamientos VI (corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no cortar el seudotallo) y VII (separar los brotes, sin cortar, ni dividir el seudotallo), independientemente del cultivar. Se conoce que ello varía en dependencia de la forma en que sean divididos los brotes (García *et al.*, 2002). En los tratamientos III y IV en los cuales se corta transversalmente del seudotallo y se dividen los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones sí se observó, principalmente en los cultivares 'FHIA-18' y 'FHIA-21'. Estas formas de dividir los brotes no son recomendadas porque estimulan la formación de yemas adventicias que pueden incrementar la variabilidad somaclonal (Pérez *et al.*, 1998). García *et al.* (2002) comprobaron que existen formas de dividir los brotes que favorecen la presencia del crecimiento en forma de roseta en el cultivar 'FHIA-20', lo cual disminuye cuando no se corta transversalmente el seudotallo y se dejan los brotes de menos de 1 cm de altura unidos en grupo de dos brotes o unidos a la planta madre.

La técnica del corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical favorece la eliminación del efecto de dominancia que ejerce la yema apical sobre las yemas laterales, que pueden estar a veces ocultas entre los bordes basales laterales de la vaina, en su hoja correspondiente o más frecuentemente expuestas y opuestas a las axilas (Pérez *et al.*, 1998).

Según Sandoval (1989) las yemas que dan origen a los brotes o hijuelos se derivan de las laterales por desarrollo simpodial. De esta forma el balance hormonal auxinas-citoquininas endógenas en los tejidos de los brotes favorece a las últimas, la cual estimula la formación de brotes axilares.

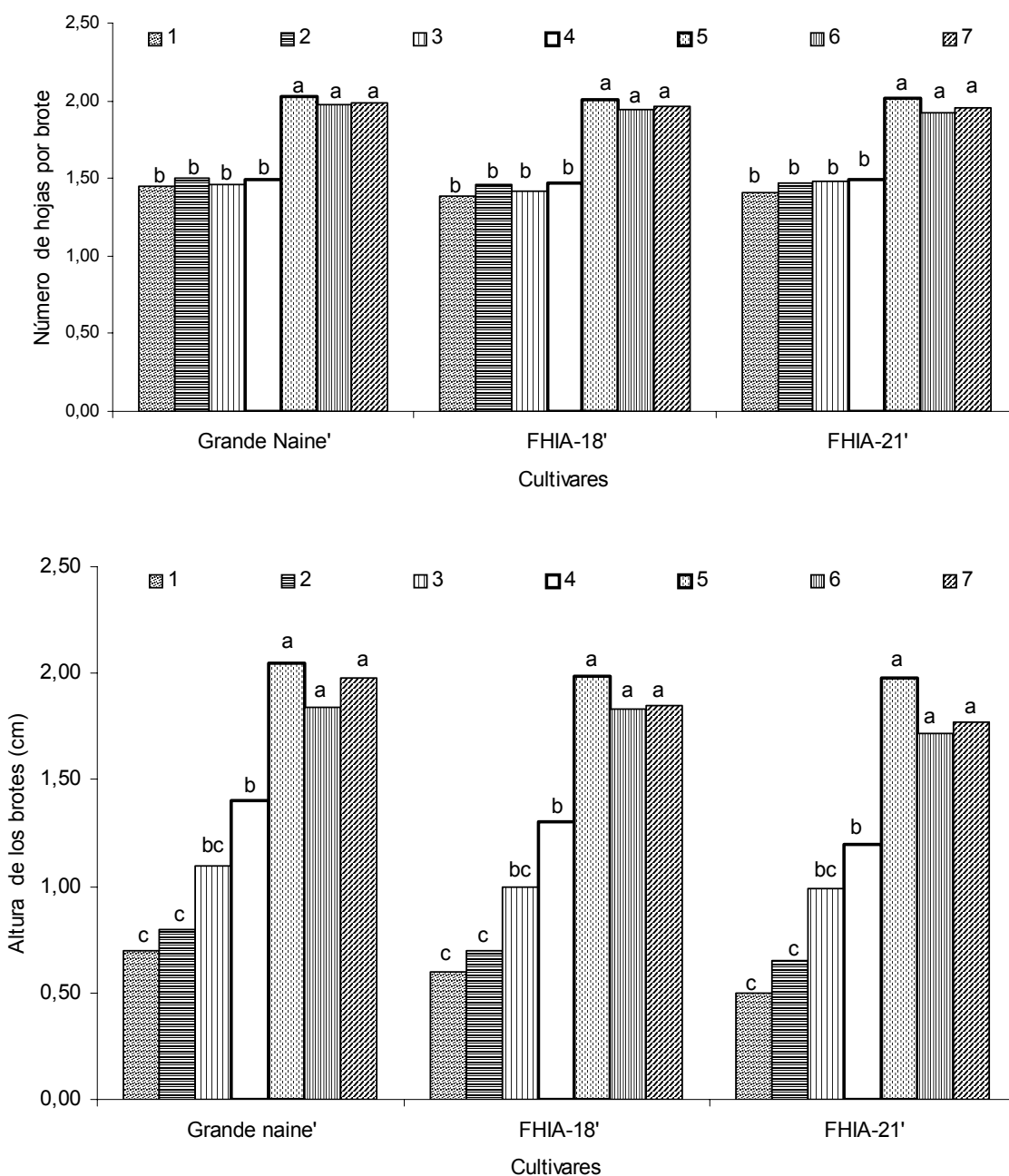
El incremento de los coeficientes de multiplicación durante la propagación *in vitro* de plátanos y bananos es importante debido a que por cada unidad que aumente este indicador, los costos de producción en una biofábrica pueden disminuir en un rango entre 0-10%, al aumentar la capacidad de incubación en cámara de luz solar, la productividad de las operarias y disminuir el consumo de agar (Pérez *et al.*, 1998).

Los resultados mostraron, además, el efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la altura y el número de hojas por explante (Figura 1 y 2).

En los tratamientos V, VI y VII donde el tamaño del micro-cormo y el sistema foliar de las plantas *in vitro* se mantienen, la altura y el número de hojas de los brotes fue significativamente superior en todos los cultivares, con respecto al resto de los tratamientos. Las sustancias de reserva en estas estructuras deben influir en la respuesta biológica de los brotes.

El corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, sin cortar transversalmente el seudotallo (VI), produjo, además, un incremento significativo del número de brotes mayores de 2.5 cm de altura que pueden enraizarse en medios de cultivo líquido (Tabla 3). Con este tratamiento no se afecta el tamaño de los órganos encargados de producir y almacenar las sustancias de reserva, que los brotes posteriormente utilizan fuente de nutrición junto a los componentes del medio de cultivo para incrementar su crecimiento y desarrollo.

El estado líquido del medio de cultivo enraizamiento, reduce el tiempo requerido para que las plantas alcancen los indicadores de calidad para su transferencia a fase de aclimatización (de 21 a 15 días) al parecer por la mayor altura con que los brotes pasan a esta fase y por absolver con mayor facilidad los nutrientes del medio cultivo. Además, se produce una disminución del consumo de agar. Un aspecto importante es que este agente gelificante representa el 90% de los costos de los medios de cultivo (Pérez *et al.*, 1998).



Barras con letras iguales indican que las medias no presentan diferencias significativas según la prueba Tukey  $p \leq 0.05\%$ .

Figura 1. Efecto del corte y división de los brotes sobre la altura (cm) en la fase de multiplicación de tres cultivares de *Musa* spp. Los datos representan valores medios de altura por explante en seis subcultivos.  $n=100$  TRATAMIENTOS: I- Cortar el seudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y no dividir el seudotallo, II-Cortar el seudotallo a 1.0cm de altura (a partir de la base) y no dividir, III-Corte transversal del seudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, -IV Corte transversal del seudotallo a 1.0cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, V-Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, no cortar el seudotallo y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, VI- Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no cortar transversalmente el seudotallo, VII-Separar los brotes, sin cortar ni dividir el seudotallo.

Tabla 3. Número de brotes por explante que pueden ser transferidos a medios de enraizamiento líquido (e) 2.5 cm) al final del sexto subcultivo de multiplicación en tres cultivares de *Musa* spp.

Tratamiento	'Grande naine'		'FHIA- 18'		'FHIA-21'	
	Total de brotes	Brotes $\geq$ 2.5cm	Total de brotes	Brotes $\geq$ 2.5 cm	Total de brotes	Brotes $\geq$ 2.5 cm
I	1.98 c	0.98 c	1.95 c	0.45 d	1.85 c	0.50 d
II	2.51 b	1.21 c	2.35 b	1.00 c	2.25 b	1.24 c
III	2.50 b	0.50 d	2.40 b	0.40 d	2.31 b	0.30 bc
IV	2.78 ab	0.78 cd	2.69 ab	0.50 d	2.55 ab	0.66 d
V	2.80 a	1.70 b	2.75 a	1.60 b	2.59 a	1.55 b
VI	2.96 a	2.10 a	2.90 a	2.00 a	2.80 a	1.99 a
VII	2.80 a	1.70 b	2.75 a	1.60 b	2.59 a	1.55 b
CV %	9.87	15.9	8.5	14.6	7.9	17.5
ES	2.63 $\pm$ 0.1	1.07 $\pm$ 0.23	2.52 $\pm$ 0.13	0.99 $\pm$ 0.21	2.43 $\pm$ 0.16	1.04 $\pm$ 0.22

Medias con letras iguales no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p \leq 0.05\%$ .  $n=100$ . TRATAMIENTOS: I- Cortar el seudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y no dividir el seudotallo, II-Cortar el seudotallo a 1.0cm de altura (a partir de la base) y no dividir, III-Corte transversal del seudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, -IV Corte transversal del seudotallo a 1.0cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, V-Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, no cortar el seudotallo y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del seudotallo en dos o tres fracciones, VI- Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no cortar transversalmente el seudotallo, VII-Separar los brotes, sin cortar ni dividir el seudotallo.

## CONCLUSIONES

La forma de corte y división de los brotes tuvo influencia en la multiplicación *in vitro* de tres cultivares de *Musa* spp. Se logró con el empleo de un corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no cortar transversalmente el seudotallo, un incremento significativo del número de brotes por explante en todos los cultivares evaluados. Adicionalmente, proporcionó plantas de mayor altura, requeridas para ser transferidas a la fase de enraizamiento en medios de cultivo líquidos.

## REFERENCIAS

- Borroto, C, Gil E, Pujol M (2006) Seguridad alimentaria, Semillas y Biotecnología: El caso de Cuba. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), pp. 1-11, La Habana, Cuba.
- García, L, Pérez B, Sarriá, Z, Clávelo J (2002) Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar Híbrido FHIA-21. INFOMUSA 11 (1): 35 – 37
- Orellana, P, Suárez M, Triana R, Zarría Z, Pons M, González M, Pérez Z (2008) Elementos básicos

para la planificación de la producción *in vitro* en biofábricas. En Resúmenes / Abstracts. VIII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, p. 17

Murashige, T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497

Pérez, J, Jiménez E y Agramonte D (1998) Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, pp. 179-190, IBP, Santa Clara

Pérez, J, Ramírez, D, Jiménez, E, Martínez, S, Quiñónez, R (1996) Influencia del manejo y los medios de cultivo en la micropropagación del género *Musa*. En: Resúmenes/Abstracts. IV Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, p. 21-22

Sandoval, J (1989) Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa* AAA). *CORBANA* 24 (51): 43-59

Vasil, IK (1994) Automation of plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39: 105 – 108