

Efecto del uso combinado de citoquininas en la formación de yemas adventicias en banano cv. 'Gros Michel' (*Musa AAA*)

Idalmis Bermúdez-Carabaloso¹, Mayelín Rodríguez Urquiza¹, Alejandro Jiménez Padrón²

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: idalmis@ibp.co.cu

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Licenciatura en Biología, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.

RESUMEN

Las citoquininas se emplean para la formación de yemas adventicias pero altas concentraciones pueden tener efectos negativos en la regeneración de plantas. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de diferentes combinaciones de citoquininas en la formación de yemas adventicias de banano 'Gros Michel' (*Musa AAA*). Se estudiaron diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (2.0, 4.0 y 6.0 mg l⁻¹) y de Tidiazuron (0.6, 0.8, 1.0 mg l⁻¹) para lograr la formación de dichas estructuras. Como controles se emplearon 22.5 mg l⁻¹ de 6-BAP y 2.0 mg l⁻¹ de TDZ, ampliamente empleados para estos fines en este cultivo. El tratamiento con 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ fue el que logró mayor porcentaje de formación de yemas adventicias, con el 80% de los explantes, con resultados muy superiores a los alcanzados por los controles y demás combinaciones estudiadas. Con este tratamiento se logró como promedio 2.72 de yemas adventicias por explante con 1.24 brotes por explante a los 60 días de cultivo. Por lo antes planteado se seleccionó esta combinación de citoquininas para la formación de yemas adventicias, ya que se logró disminuir los niveles de 6-BAP y de TDZ que tienen efectos negativos en la posterior regeneración de las plantas.

Palabras clave: bananos, 6- Bencilaminopurina, Tidiazuron

Effect of the cytokinins combination on adventitious buds formation in banana cv. 'Gros Michel' (*Musa AAA*)

ABSTRACT

Cytokinins are used for adventitious buds formation but high concentrations may have negative effects on plant regeneration. The aim of the present investigation was to determine the effect of different combinations of cytokinins on the induction of adventitious buds of cultivar 'Gros Michel' (*Musa AAA*). Different concentrations of 6-Benzylaminopurine (2.0, 4.0 and 6.0 mg l⁻¹) and Thidiazuron (0.6, 0.8, 1.0 mg l⁻¹) were studied to achieve the formation of these structures. As controls, 22.5 mg l⁻¹ 6-BAP and 2.0 mg l⁻¹ TDZ, widely used for these purposes in this culture, were used. The treatment with 2.0 mg l⁻¹ 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ TDZ was the one that achieved the highest percentage of adventitious buds formation, with 80% of the explants, with results much higher than those achieved by the controls and other combinations studied. With this treatment, an average of 2.72 adventitious buds per explant was obtained with 1.24 shoots per explant at 60 days of culture. For this reason, this combination of cytokinins was selected for the formation of adventitious buds in banana cv. 'Gros Michel', as it was possible to decrease the levels of 6-BAP and TDZ that have negative effects on the subsequent plants regeneration.

Keywords: bananas, 6- Benzylaminopurine, Thidiazuron

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa spp.*) proporcionan a millones de personas en todas las zonas tropicales y subtropicales alimentos de primera necesidad y una de las frutas que más se exportan (Ngomuo *et al.*, 2014). Debido a los bajos rendimientos y a la susceptibilidad

a las enfermedades, principalmente a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y al Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), se hace necesaria la búsqueda de nuevos cultivares para su introducción a la producción. El mejoramiento genético en el género *Musa* mediante métodos tradicionales se ha visto obstaculizado por

varios factores, entre ellos la baja fertilidad, la esterilidad, los niveles de ploidía y la falta de variabilidad genética que muestran sus especies (Huang *et al.*, 2010), además del tiempo que se necesita para obtener cultivares mejorados por esta vía.

El empleo del cultivo de tejidos para los programas de mejoramiento genético constituye una herramienta de gran potencial, pero se hace necesario disponer de un sistema eficiente y repetible de regeneración de plantas (Roux, 2004). El uso de yemas adventicias para estos fines en *Musa* spp. ha sido informado por varios autores (Nahamya, 2000; García *et al.*, 2006; Sadik *et al.*, 2007) ya que la variabilidad puede incrementarse.

De los reguladores del crecimiento, 6-Bencilaminopurina (6-BAP) tiene un marcado efecto en la formación y multiplicación de yemas axilares y adventicias en los cultivos *in vitro* (Abeyaratne y Lathiff, 2002; Buah *et al.*, 2010).

Sin embargo, el tidiazuron (TDZ) al ser más activo a bajas concentraciones que 6-BAP y ser menos susceptible a las enzimas degradantes presentes en las plantas, permitió el desarrollo de yemas múltiples en el cultivar 'Grande naine' (AAA) (García *et al.*, 2006). Se ha informado que el TDZ, puede ser muy activo en la regulación de la morfogénesis en muchas especies de plantas (Sunagawa *et al.*, 2007).

Los resultados referidos en la literatura especializada sobre plátanos y bananos, indican que la inducción del proceso embriogénico continúa perfeccionándose también con el uso de otros reguladores del crecimiento como el TDZ, a diferencia de los medios de cultivo en los que se emplean altas concentraciones de 6-BAP (Suprasanna *et al.*, 2002; INIBAP, 2003). Sin embargo, según Sadik *et al.* (2007) el uso de estas altas concentraciones de 6-BAP y TDZ, tiene entre sus desventajas la variación somaclonal y el decrecimiento de la respuesta embriogénica del explante. En este sentido, hay numerosos informes que muestran las deficiencias del uso de altos niveles de citoquininas que producen anormalidad y se afecta la estabilidad genética de las plantas (Martin *et al.*, 2006; Shirani *et al.*, 2009; Najmeh *et al.*, 2011). Por todo lo antes expuesto se hace necesario determinar el

efecto de diferentes combinaciones de citoquininas en la formación de yemas adventicias en banano cultivar 'Gros Michel' (*Musa* AAA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron ápices de plantas crecidas en campo del cultivar 'Gros Michel', obtenidos de hijos tipo espada con una altura aproximada de 50 a 100 cm de altura que fueron establecidos *in vitro* de acuerdo con la metodología propuesta por Orellana (1995).

Se utilizaron tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo líquido compuesto por sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% y ácido indol acético (AIA) (0.23 mg l⁻¹), 6-BAP (4 mg l⁻¹), sacarosa (30 g l⁻¹), mio-inositol (100 mg l⁻¹) y pH 5.7. Como soporte se colocó papel de filtro en forma de m. El pH se ajustó, con el uso del HCl o NaOH, a 5.8 previo a la esterilización de los medios de cultivo. Esta se realizó en autoclave vertical a 121 °C y una presión de 1.2 kg cm⁻², durante 20 minutos.

Efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP y TDZ

Con el objetivo de determinar la influencia de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias, se colocaron brotes seccionados de 0.4 mm² provenientes de la fase de establecimiento *in vitro*. Se empleó el medio de cultivo de multiplicación de brotes, constituido por las sales y vitaminas MS al 100%, sacarosa (30 g l⁻¹), ácido ascórbico (10 mg l⁻¹), AIA (0.2 mg l⁻¹), pH 5.7 y Gelrite (MERCK) (2.0 g l⁻¹) con diferentes concentraciones de las citoquininas estudiadas (Tabla 1). Como controles se emplearon los medios de cultivo P4 (Tratamientos 10) compuesto por Sales y vitaminas MS, sacarosa (30 g l⁻¹), mio-inositol (100 mg l⁻¹), ácido ascórbico (10 mg l⁻¹), AIA (0.17 mg l⁻¹), 6-BAP (22.5 mg l⁻¹), pH 5.8 y se utilizó Phytigel® (SIGMA) 2.2 g l⁻¹ como agente gelificante, según Schoofs *et al.* (1998). En el tratamiento 11, se empleó el medio de cultivo compuesto por Sales y vitaminas MS, sacarosa (30 g l⁻¹), mio-inositol (100 mg l⁻¹), ácido ascórbico (10 mg l⁻¹), AIA (0.17 mg l⁻¹), TDZ (2 mg l⁻¹), pH

Tabla 1. Concentraciones de las citoquininas empleadas en el medio de cultivo para la formación de las yemas adventicias en el cv. 'Gros Michel' (AAA).

Tratamientos	Concentración citoquininas (mg l ⁻¹)	
	6-BAP	TDZ
1	2.0	0.6
2	4.0	0.6
3	6.0	0.6
4	2.0	0.8
5	4.0	0.8
6	6.0	0.8
7	2.0	1.0
8	4.0	1.0
9	6.0	1.0
10 (Control)	22.5	-
11 (Control)	-	2

5.8 y se utilizó Phytigel® (SIGMA) 2.2 g l⁻¹ como agente gelificante, según Nahamya (2000).

En este trabajo se nombraron yemas adventicias a las estructuras globosas, de color blanquecino, de 1.0 a 3.0 mm de longitud, que se desarrollaban en la superficie del explante.

Los subcultivos se realizaron cada 30 días de cultivo. Se cuantificó el número de explantes por frasco de cultivo que formaron yemas adventicias y se calculó el porcentaje. Además, se cuantificó el número de yemas adventicias y de brotes por explante. Se colocaron cinco explantes por frasco y se utilizaron cinco frascos por tratamiento. El segundo subcultivo se realizó solamente en los medios de cultivo que contenían las citoquininas que estimularon el desarrollo de las yemas adventicias. Las condiciones de cultivo del material vegetal fueron a 27±2°C en cámaras de cultivo de luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre 48.0-62.5 µmol m⁻²s⁻¹.

Análisis estadístico

El diseño experimental empleado fue completamente aleatorizado. El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó con la ayuda del Paquete estadístico *Statistic Packaged for Social Science (SPSS)* versión 18.0 para Windows (Microsoft ®). Se

utilizó la prueba H de Kruskal Wallis y la U de Mann Whitney, al no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza para los datos. Se empleó un nivel de significación de p≤0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar el porcentaje de explantes que formaron yemas adventicias se pudo apreciar que en todas las combinaciones de las citoquininas estudiadas (6-BAP y TDZ) se observó formación de dichas estructuras a los 60 días de cultivo (segundo subcultivo). En el tratamiento siete donde se empleó 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ, se obtuvo el mayor porcentaje, con el 80% de los explantes con formación de yemas adventicias. Estos resultados fueron superiores a los alcanzados en los controles y demás combinaciones estudiadas (Fig. 1).

Nahamya (2000) logró una alta proliferación de yemas adventicias con formación de domos meristemáticos en varios cultivares de bananos (*Musa AAA*) del este de África al emplear el TDZ a una concentración de 2.0 mg l⁻¹ y 30 mg l⁻¹ de 6-BAP, respectivamente. Así mismo, Arinaitwe *et al.* (2000) refirieron un incremento en la proliferación de yemas adventicias cuando se incrementó la concentración de TDZ de 0.02 mg l⁻¹ a 3.35 mg l⁻¹. Estos autores atribuyeron la alta actividad citoquinínica del TDZ, a su capacidad de acumular en el cultivo de tejidos altos niveles

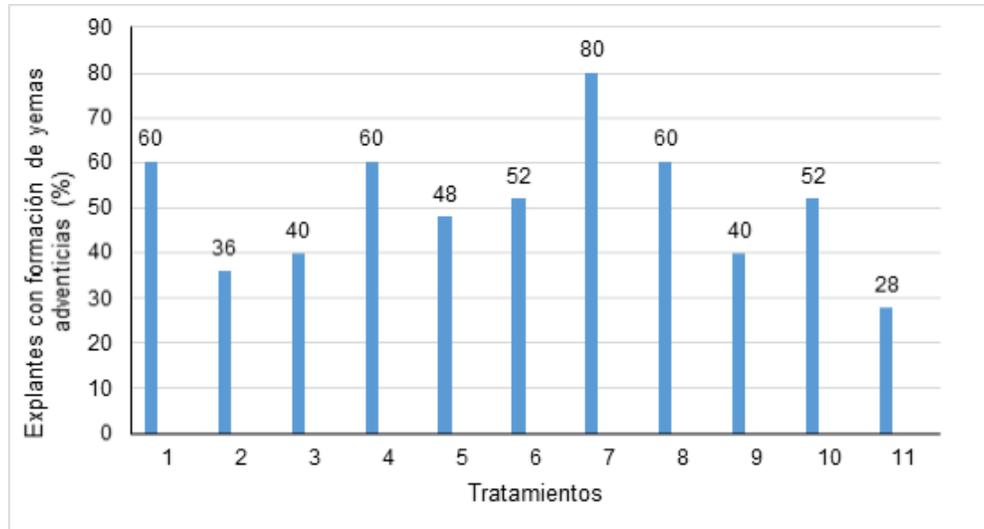


Figura 1. Formación de yemas adventicias en banano cv. 'Gros Michel' (AAA) a los 60 días de cultivo con combinaciones de 6-BAP y TDZ. Tratamientos: 1) 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.6 mg l⁻¹ de TDZ, 2) 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.6 mg l⁻¹ de TDZ; 3) 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.6 mg l⁻¹ de TDZ, 4) 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.8 mg l⁻¹ de TDZ, 5) 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.8 mg l⁻¹ de TDZ, 6) 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.8 mg l⁻¹ de TDZ, 7) 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ, 8) 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ, 9) 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ, 10) 22.5 mg l⁻¹ de 6-BAP, 11) 2.0 mg l⁻¹ de TDZ.

Tabla 2. Efecto de las diferentes concentraciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias de banano cv. 'Gros Michel' (AAA) a los 60 días de cultivo.

Tratamientos	No. de yemas adventicias/explante		No. de brotes/explante	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
1	0.94	25.47 b	2.84	26.47 ab
2	0.48	20.24 c	1.60	19.48 b
3	0.66	20.63 c	3.08	22.67 a
4	1.16	23.10 b	2.84	22.32 ab
5	1.43	21.52 b	3.21	22.61 a
6	1.08	22.80 b	1.52	19.38 b
7	2.72	27.04 a	1.24	18.62 b
8	1.32	20.98 b	1.68	20.98 b
9	0.52	20.79 c	2.04	21.81 ab
10	1.56	23.36 b	1.92	20.04 b
11	0.40	19.52 c	3.88	24.80 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para $p \leq 0.05$ según la prueba *H* de Kruskal Wallis y *U* de Mann Whitney. Tratamientos: 1) 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.6 mg l⁻¹ de TDZ, 2) 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.6 mg l⁻¹ de TDZ, 3) 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.6 mg l⁻¹ de TDZ, 4) 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.8 mg l⁻¹ de TDZ, 5) 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.8 mg l⁻¹ de TDZ, 6) 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 0.8 mg l⁻¹ de TDZ, 7) 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ, 8) 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ, 9) 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ, 10) 22.5 mg l⁻¹ de 6-BAP, 11) 2.0 mg l⁻¹ de TDZ.

endógenos de dicho regulador del crecimiento. Sin embargo, en el presente trabajo fue posible disminuir las concentraciones de 6-BAP y TDZ

sin afectarse la formación de yemas adventicias, incluso con resultados superiores al combinar ambas citoquininas.

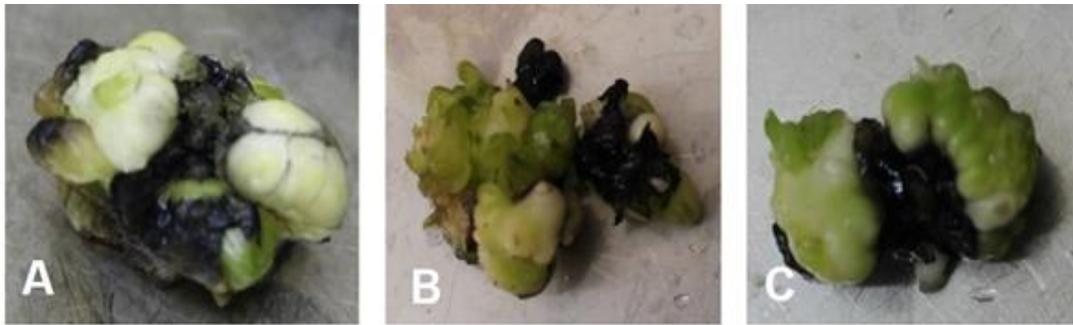


Figura 2. Yemas adventicias de banano cv. 'Gros Michel' (AAA) a los 60 días de cultivo con diferentes concentraciones de 6-BAP y TDZ. A) 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ B) 22.5 mg l⁻¹ de 6-BAP, C) 2.0 mg l⁻¹ de TDZ.

Los mejores resultados con respecto al número de yemas adventicias por explante se alcanzaron en el tratamiento con 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP + 1.0 mg l⁻¹ de TDZ, con diferencias significativas con los controles donde se emplearon 22.5 mg l⁻¹ de 6-BAP y 2.0 mg l⁻¹ de TDZ. Con este tratamiento se obtuvieron como promedio 2.72 yemas adventicias por explante con 1.24 brotes por explante a los 60 días de cultivo (Tabla 2 y Fig. 2). Por ello, se seleccionó este como el mejor tratamiento para la formación de yemas adventicias en banano cv. 'Gros Michel'.

Al respecto, Gubbuk y Pekmezci (2004) y Makara *et al.* (2010) plantearon que concentraciones altas de citoquininas en el medio de cultivo aumentan la proliferación de yemas múltiples, pero se afecta la posterior elongación de los brotes.

Resultados similares a los alcanzados en la presente investigación fueron referidos por Sadik *et al.* (2007) quienes demostraron que al combinar TDZ y 6-BAP en menor concentración, lograron obtener las yemas adventicias en los cultivares 'Musakala' (*Musa AAA*), 'Kibuzi' (*Musa AAA*), 'Mbwazirume' (*Musa AAA*), 'Lwadungu' (*Musa AAA*). El efecto combinado de las dos citoquininas en el medio de cultivo parece haber influido en la asimilación de estos reguladores del crecimiento por los tejidos vegetales, que probablemente causó un efecto aditivo, lo cual estimuló la multiplicación de las yemas adventicias.

CONCLUSIONES

Se logró la formación de yemas adventicias en el cultivar de banano 'Gros Michel' (*Musa AAA*)

al emplear de manera combinada 6-BAP y TDZ a menores concentraciones que las que tradicionalmente se utilizan.

REFERENCIAS

- Abeyaratne W, Lathiff M (2002) *In vitro* propagation of 'Rathambala' (*Musa AAA*) and the occurrence of phenotypic variations in the pseudostem. *Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture (LKA)* 4: 191-197
- Arinaitwe G, Rubaihayo PR, Magambo MJS (2000) Proliferation rate effect of cytokinins on banana (*Musa spp.*) cultivars. *Sci Horticult* 86(1):13-21
- Buah J, Danso E, Taah K, Abole E, Bediako E, Asiedu J, Baidoo R (2010) The effects of different concentration cytokinins on the *in vitro* multiplication of plantain (*Musa spp.*). *Biotechnology* 9(3): 343-347; doi: 10.3923/biotech.2010.343.347
- García LR, Pérez JP, Bermúdez-Caraballosa I, Orellana P, Veitía N, García L, Padrón Y, Romero C (2006) Nuevo protocolo para la rápida inducción de yemas adventicias y la regeneración de plantas en banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*). *Biotecnología Vegetal* 6(1): 15-21
- Gubbuk H, Pekmezci M (2004) *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa spp.*). *Turkish Journal of Agricultural and Forestry* 28 (5): 355-361
- Huang X, Lu XY, Zhao JT, Chen JK, Dai XM, Xiao W, Chen YP, Chen YF, Huang XL (2010) *MaSERK1* gene expression associated with somatic embryogenic competence and disease resistance response in banana (*Musa spp.*). *Plant Mol Biol* 28 (2):309-316; doi: 10.1007/s111050090150

INIBAB (2003) Networking Banana and Plantain: INIBAB Annual Report 2002. Biversity international, Montpellier

- Makara AM, Rubaihayo PR, Magambo MJS (2010) Carry-over effect of Thidiazuron on banana *in vitro* proliferation at different culture cycles and light incubation conditions. African Journal of Biotechnology 9(21):3079-3085
- Martin K, Pachathundikandi S, Zhang C, Slater A, Madassery J (2006) RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. 'Grande naine' and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42(2): 188-192; doi:10.1079/IVP2005736
- Murashige T, Skoog R (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Nahamya P (2000) Development of embryogenic cell suspensions for East African highland bananas. Tesis para optar por el Grado Académico de Master en Ciencias, Makerere University Kampala, Kampala, Uganda
- Najmeh J, Yasmin OR, Norzulaani K (2011) Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. 'Berangan'. African Journal of Biotechnology 10 (13): 2446-2450; doi:10.5897/AJB1001149
- Ngomuo M, Mneney E, Ndakidemi PA (2014) The *in vitro* propagation techniques for producing banana using shoot tip cultures. American Journal of Plant Sciences 5: 1614-1622; doi:10.4236/ajps2014.511175
- Orellana P (1995) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis para aspirar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, UCLV, Santa Clara, Cuba
- Roux NS (2004) Mutation induction in *Musa*-Review. En: Jain SM, Swennen R (eds) Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations, pp. 23-32. Science, Enfield; ISBN: 1-57808-340-0
- Sadik K, Rubaihayo P, Magambo M, Pillay M (2007) Generation of cell suspensions of East African highland bananas through scalps. African Journal of Biotechnology 6(11): 1352-1357
- Shirani S, Mahdavi F, Maziah M (2009) Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa* spp.) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips. African Journal of Biotechnology 8(21): 5755-5761
- Sunagawa S, Sakae A, Makiko U, Yuko M, Akihiro N (2007) Effect of urea-type cytokinins on the adventitious shoots regeneration from cotyledonary node explant in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Production Science 10 (1): 47-56; doi: 10.1626/pps.10.47
- Suprasanna P, Sági L, Swennen R (2002) Positive selectable marker genes for routine plant transformation. *In Vitro Cellular and Dev Biology Plant* 38(2): 25-128; doi:10.1079/IVP2001272
- Schoofs H, Panis B, Swennen R (1998) Competence of scalps for somatic embryogenesis in *Musa*. Acta Horti 490 (1): 475-483

Recibido: 12-10-2016
Aceptado: 07-12-2016