

Título: Efecto de la benciladenina y el ácido indolacético en la propagación *in vitro* de bananos (*Musa spp.* AAA).

Effect of benzyladenine and indoleacetic acid in vitro propagation of banana (*Musa spp.* AAA).

Autores: Yulién Miguélez Sierra¹, Surafel Shribru²

Centro de Trabajo: ¹Centro Universitario de Guantánamo. Carretera Guantánamo-Santiago de Cuba km 2½, Guantánamo, Cuba, CP 95100.

²Melkassa Agricultural Research Center, Ethiopian Institute for Agricultural Research, Melkassa, Ethiopia, P.O. Box 436 Melkassa-Nazareth.

E-mail: yulien@fam.cug.co.cu

Resumen.

El efecto de la benciladenina (BA) (0, 3 y 4 mg/L) y el ácido indolacético (AIA) (0, 0.2 y 0.6 mg/L) fue evaluado en la proliferación *in vitro* de brotes de tres cultivares de bananos, 'Dwarf Cavendish', 'Giant Cavendish' y 'Poyo'. Se obtuvo formación de brotes con BA solo o con AIA. En el segundo subcultivo el BA solo a 3 mg/L indujo de 3 a 4 brotes por explante en todos los cultivares. El incremento del BA o la adición de AIA no tuvieron un efecto significativo en la proliferación de brotes en este subcultivo. Por el contrario, la inducción de brotes en el cuarto subcultivo fue significativamente superior con BA y AIA (0.2 mg/L) y el BA a 4 mg/L incrementó la respuesta, especialmente, en 'Poyo'. Los resultados indican la importancia de una adecuada selección del balance hormonal para todas las fases de la multiplicación en estos cultivares.

Palabras clave: bananos, propagación *in vitro*, benciladenina, ácido indolacético

Abstract.

The effect of benzyladenine (BA) (0, 3 and 4 mg/L) and indol-3-acetic acid (IAA) (0, 0.2 and 0.6 mg/L) was tested in the induction of *in vitro* shoot proliferation on three commercial banana cultivars, 'Dwarf Cavendish', 'Giant Cavendish' and 'Poyo'. Axillary bud formation was achieved in presence of BA alone or in combination with IAA. In the second subculture of multiplication BA 3 mg/L alone was enough to induce three or more shoots per explant in all varieties. Increment of BA concentration or addition of IAA had not superior effect on shoot proliferation at this stage. On the contrary, the shoot induction on subculture four was significantly better in combinations of BA and IAA 0.2 mg/L, BA 4 mg/L enhanced the response, especially in 'Poyo'. Results leads to the importance of selecting adequate hormones balance for the whole multiplication process.

Keywords: banana, *in vitro* shoot proliferation, benzyladenine, indol-3-acetic acid.

Introducción.

La micropropagación de bananos fue aplicada inicialmente a los cultivares 'Cavendish' (AAA) con el cultivo de brotes apicales como vía para obtener la rápida multiplicación de material de plantación libre de enfermedades. Desde entonces, esta técnica se ha aplicado a un amplio rango de variedades locales y comerciales y se ha extendido su aplicación debido a las conocidas ventajas de la micropropagación sobre las técnicas convencionales de propagación (Pérez, 1998; Smith *et al.*, 2004). La optimización de la fase de multiplicación es un aspecto crítico en el cultivo de tejidos de bananos. Usualmente, se usan dos tipos de reguladores del crecimiento, una citoquinina y una auxina, para inducir proliferación de brotes y la concentración y la proporción entre ellas determina el crecimiento y la morfogénesis de los tejidos de banano (Zaffari, 2000). La concentración de citoquinina exógeno es el principal factor que afecta la multiplicación de bananos y la más comúnmente usada para iniciar proliferación de brotes es la benciladenina a concentraciones desde 2.25 a 5 mg/L con óptimos resultados a 4 mg/L. BA ha demostrado ser superior a la kinetina, el N⁶-(2-isopentenil)adenina (2iP) y a la zeatina para la mayoría de los cultivares (Wong, 1986; Bekheet and Saber, 1999, Strosse *et al.*, 2004). Muchos laboratorios comerciales usan el BA solo entre 3 y 5 mg/L o bajas concentraciones de ácido indolacético (AIA) y BA para sus medios de multiplicación debido a las aceptables tasas de multiplicación y el menor riesgo de variación somaclonal que se obtienen en este rango (Bairu *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2006).

Comúnmente, los estudios sobre la influencia de hormonas en la proliferación de brotes se realizan hasta el tercer subcultivo. Sin embargo, en las propagaciones posteriores la tasa de multiplicación disminuye y por tanto el requerimiento de hormonas puede variar para alcanzar una mejor respuesta. En el presente estudio, se evalúa la proliferación de brotes *in vitro* de tres cultivares comerciales de bananos usando BA y AIA en el segundo y cuarto subcultivo de la multiplicación para determinar la influencia de estas hormonas en cada etapa.

Materiales y métodos.

La investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Agrícolas de Melkassa (MARC) del Instituto de Investigación de la Agricultura de Etiopía (EIAR). Los cultivares estudiados fueron 'Dwarf Cavendish', 'Giant Cavendish' y 'Poyo', todos de genotipo AAA. Las plantas se tomaron de la colección de germoplasma de MARC. Los brotes usados para los

experimentos se colectaron a partir de cultivos en proliferación después del primer subcultivo en medio de multiplicación con 3 mg/L de BA. Las sales completas de Murashige y Skoog (MS) (1962) se usaron como medio basal que fue suplementado con tiamina 1 mg/L, myoinositol 100 mg/L, sacarosa 30 g/L y agar 8 g/L. El pH del medio fue ajustado a 5.7. En la inducción de brotes se evaluó el BA (0, 3 y 4 mg/L) y el AIA (0, 0.2 y 0.6 mg/L).

El período de subcultivo fue de cuatro semanas, se usaron siete explantes por recipiente de cultivo de 350 ml de capacidad con 40 ml de medio de cultivo. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un fotoperíodo de 16 horas y $37 \mu\text{M s}^{-1} \text{m}^{-2}$ de intensidad luminosa. El número de brotes por explante y el coeficiente de multiplicación se evaluaron en el segundo y cuarto subcultivos. El coeficiente de multiplicación se determinó como el número de explantes obtenidos a partir del explante inicial después de cuatro semanas de cultivo, es decir, al final de cada subcultivo cuando los clusters de brotes se separan según su tamaño para cultivarlos de forma independiente. Los brotes de un centímetro de altura y más se individualizaron y los explantes más vigorosos se dividieron longitudinalmente en dos partes. Los datos se analizaron con ANOVA al 95% y el Test de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$). El programa Statgraphics Plus 5.0 se empleó para el procesamiento de los datos.

Resultados y discusión.

Los resultados de la proliferación de brotes y el coeficiente de multiplicación en respuesta a las concentraciones de BA y AIA se muestran en la Tabla 1 para el segundo subcultivo y en la Tabla 2 para el cuarto subcultivo. En ambos subcultivos no hubo proliferación de brotes en el medio sin reguladores del crecimiento para los tres cultivares.

En el segundo subcultivo, el número de brotes por explante en todos los cultivares no se incrementó significativamente con el aumento de BA de 3 a 4 mg/L o con la adición de AIA al medio de cultivo. Para 'Dwarf Cavendish' no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de BA y sus combinaciones con AIA lo cual indica que dentro del rango de 3 a 4 mg/L de BA la proliferación de brotes puede ser inducida hasta obtener tres brotes por explante. En este cultivar el coeficiente de multiplicación fue mayor en los tratamientos con 4 mg/L de BA y 4 mg/L BA + 0.2 mg/L AIA (3.57 y 3.19 respectivamente). Entre los tratamientos con hormonas el promedio más bajo (2.33) se obtuvo en la combinación de 4 mg/L BA + 0.6 mg/L de AIA. Nandi y Chaudhari (1997) también obtuvieron una buena proliferación de brotes durante los tres primeros subcultivos usando BA solo a 5 mg/L en

brotos apicales de los genotipos AAA de cultivares de dwarf enano, 'Basrai' y 'Shrimantio'. En algunos cultivares africanos Talengera *et al.* (1994) encontraron mejor inducción de brotes con 4.5 mg/l de BA solo que usando combinaciones de BA y ácido naftalenacético (ANA).

La proliferación de brotes obtenida en 'Giant Cavendish' fue significativamente mayor con el BA solo que indujo cuatro brotes por explante seguido por los tratamientos 4 mg/L BA + 0.2 mg/L AIA y 3 mg/L BA + 0.6 mg/L AIA (Tabla 1). En los tratamientos sin AIA o con concentraciones de 0.6 mg/L, el coeficiente de multiplicación llegó hasta tres brotes por explante lo cual se debe, probablemente, a que se obtuvo un mayor número de brotes en el primer caso y a un efecto positivo de la auxina en el tamaño de los brotes en el segundo caso.

En el cultivar 'Poyo', el BA solo a 3 mg/L fue superior a todos los tratamientos con un promedio de 5.28 brotes por explante. Los demás tratamientos con reguladores del crecimiento no presentaron diferencias significativas entre ellos e indujeron tres brotes por explante en todos los casos (Tabla 1). El coeficiente de multiplicación fue mejor en tratamientos con 3 mg/L de BA indicando un efecto superior de esta concentración de BA en la proliferación de brotes y se obtuvo un incremento del coeficiente hasta cuatro en la combinación de BA 3 mg/L y AIA 0.6 mg/L debido al efecto de esta auxina en el tamaño de los brotes que permite separarlos del explante.

La respuesta en el cuarto subcultivo fue diferente al segundo para todos los cultivares. Se observó un efecto positivo de la adición de AIA a 0.2 mg/L al medio de cultivo dependiendo de la concentración específica de BA. Este efecto del balance auxina/citoquinina en el mejoramiento de la proliferación de brotes comparado con la citoquinina sola ha sido observado en algunos cultivares de bananos. Para los cultivares africanos 'Kibuzi' (AAA-EA), 'Bwara' (AAA-EA) y 'Ndiziwemiti' (ABB) se han obtenido tasas de proliferación en el rango de 4.6 -8.5 con BA 3.78-5.59 mg/L combinado con AIB 0.24 mg/L (Arinaitwe, 1999). Rahman *et al.* (2005) lograron la mayor multiplicación de brotes (4.52 por explante) y el mayor tamaño de los brotes (3.62 cm) en el cultivar 'BARI-I' cuando usaron 4.0 mg/L BA+1.5 mg/L ANA.

En este subcultivo, el número de brotes para 'Dwarf Cavendish' fue más bajo con BA solo y con la combinación de 4 mg/L BA + 0.6 mg/L AIA, esta última también indujo el menor coeficiente de multiplicación después del control MS (Tabla 2). El número de brotes fue mayor en las combinaciones de BA 3 mg/L con AIA y en el tratamiento con 4 mg/L BA + 0.2

mg/L AIA, el cual indujo el mayor promedio con 3.45 brotes por explante y, además, mostró el mayor coeficiente de multiplicación con 3.16 lo cual indica la superioridad de este tratamiento en ambos subcultivos para este parámetro. En este cultivar, solo los tratamientos con BA + IAA 0.2 mg/L indujeron tres brotes por explante. Una respuesta similar en cuanto a la adición de AIA al medio de multiplicación ha sido obtenida por Gübbük and Pekmezci (2004) en 'Dwarf Cavendish', ellos encontraron que al utilizar BA o Tiazuron (TDZ) con 0.17 mg/L de AIA se incrementó la elongación de los brotes en comparación con el uso de BA o TDZ solo, lo cual determinó una mayor emisión de brotes.

En 'Giant Cavendish' se observó que el BA solo fue inferior a los tratamientos con AIA en la inducción de brotes y en el coeficiente de multiplicación. No obstante, ningún tratamiento llegó a tres brotes por explante lo cual indica una reducción de la proliferación de brotes en este subcultivo comparado con los mismos tratamientos en el segundo subcultivo. El mayor número de brotes (2.75) y coeficiente de multiplicación (2.20) se obtuvieron con el tratamiento que contenía BA 3 mg/L + IAA 0.2 mg/L.

En el caso de 'Poyo', los mejores tratamientos en la inducción de brotes fueron BA 4 mg/L y BA 3 mg/L + AIA 0.2 mg/L con 3.44 y 3.25 brotes, respectivamente, seguido por las combinaciones de BA (4 mg/L) y AIA. En el coeficiente de multiplicación, 4 mg/L de BA solo y 4 mg/L de BA + 0.6 mg/L de AIA fueron mejores lo que apunta a un mejor resultado del BA a 4 mg/L en este subcultivo. En este cultivar también se observa la reducción en la formación de brotes en comparación con el subcultivo anterior. Este es un fenómeno común en la inducción de brotes axilares de bananos que se debe a la reducción o agotamiento de las yemas preexistentes después de varios subcultivos (Lee, 2005).

Como se observó, la respuesta a la inducción de brotes varía en dependencia de la variedad, la composición hormonal en el medio de cultivo y el número de subcultivos. En resumen, en un estadio temprano de la multiplicación la formación de brotes no se incrementó significativamente por el incremento de la citoquinina de 3 a 4 mg/L o la adición de AIA. Sin embargo, en el cuarto subcultivo, cuando el potencial de proliferación de brotes disminuye, se obtuvo una mejor respuesta con el empleo de las combinaciones de BA y AIA o el incremento de la concentración de BA dependiendo del cultivar. Estos resultados indican que la selección de un adecuado balance hormonal en todo el proceso de multiplicación es necesaria para optimizar la respuesta de los explantes en los diferentes subcultivos.

Bibliografías.

1. Arinaitwe G., P.R. Rubaihayo, M.J.S. Magambo. (1999). Effects of auxin/cytokinin combinations on shoot proliferation in banana cultivars. *African Crop Science Journal (UGA)*. 7(4): 605-611.
2. Bekheet S. A. & M. M. Saker. (1999). Rapid mass micropropagation of banana. *Bulletin of the National Research Centre (EGY)*. 24(2):221-231.
3. Bairu M.W., C. W. Fennella, J. van Staden. (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa AAA* cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae (NLD)*. 108 (4): 347-351.
4. Gubbuk H., M. Pekmezci. (2004). *In Vitro* propagation of some new banana types (*Musa spp.*). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 28 (5):355-361.
5. Lee S.W. (2005). Thidiazuron in the improvement of banana micropropagation. *Acta Horticulturae* 692: Proceedings of the Second International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. (W. C. Chang & R. Drew, eds.). ISHS, Taipei, Taiwan.
6. Matsumoto K., L. Styer & Y. Yamamoto. (2006). Response of banana dwarf somaclonal variants to benzylaminopurine. *InfoMusa*. 15(1-2): 27-29.
7. Murashige T. & F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15. 473-497.
8. Nandi M., A. N. Chaudhari. *In vitro* response in two cultivars of banana. (1997). *Journal of Maharashtra Agricultural Universities (IND)*. 22 (3). 351-352.
9. Rahman M.Z., K.M. Nasiruddin, M.A. Aminm, M.N. Islam. 2004. *In vitro* response and shoot multiplication of Banana with BAP and NAA. *Asian Journal of Plant Sciences* 3(4): 406-409.
10. Smith M. K., S. D. Hamill, D. K. Becker, J. L. Dale. (2004). *Musa spp.* Banana and Plantain. Pp 366-383 in *Biotechnology of fruit and nut crops* (R. E. Linz, ed.). CABI Publishing, USA.
11. Strosse H., I. Van Den Houwe, B. Panis.(2004). Banana Cell and Tissue Culture. Pp 1-12 in *Banana improvement: cellular, molecular biology and induced mutations* (S. Mohan Jain & R. Swennen, eds.). Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
12. Talengera D., M.J.S Magambo, P. Rubaihayo. (1994). Testing for a suitable culture medium for micropropagation of East African Highland bananas. *African Crop Science Journal (UGA)*. 2(1). 17-21.

13. Wong W. C. (1986). *In vitro* propagation of banana (*Musa spp.*): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 6(2): 159-166.
14. Zaffari G.R., G.B Kerbauy, J.E Graus, E.C Romano. (2000). Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63(3):187-192.

Anexos.

Tabla 1. Proliferación de brotes con 3 y 4 mg/L de BA y sus combinaciones con AIA en el segundo subcultivo de multiplicación de 'Dwarf Cavendish', 'Giant Cavendish' y 'Poyo'.

Variedad	Tratamientos (mg/L)	Número de brotes (brotes/explante)	Coefficiente de multiplicación
'Dwarf Cavendish'	Control (MS)	1.14b	1.09c
	3 BA	3.33a	2.85ab
	3 BA + 0.2 AIA	3.28a	3.0ab
	3 BA + 0.6 AIA	3.04a	3.09ab
	4 BA	3.38a	3.57a
	4 BA + 0.2 AIA	3.19a	3.19a
	4 BA+ 0.6 AIA	3.0a	2.33b
	ES	0.15	0.12
'Giant Cavendish'	Control (MS)	1.19c	1.19c
	3 BA	4.19a	3.23ab
	3 BA + 0.2 AIA	2.76b	2.47b
	3 BA + 0.6 AIA	3.04ab	3.61a
	4 BA	4.33a	3.28ab
	4 BA + 0.2 AIA	3.95ab	2.42b
	4 BA+ 0.6 AIA	2.61b	3.14ab
	ES	0.19	0.13
'Poyo'	Control (MS)	1.23c	1.09c
	3 BA	5.28a	3.42ab
	3 BA + 0.2 AIA	3.80b	3.33ab
	3 BA + 0.6 AIA	3.52b	4.14a
	4 BA	3.95b	2.80b
	4 BA + 0.2 AIA	3.47b	2.71b
	4 BA+ 0.6 AIA	3.23b	3.04b
	ES	0.16	0.13

Medias con diferentes letras son significativamente diferentes a $p < 0.05$.
ES error estándar

Tabla 2. Proliferación de brotes con 3 y 4 mg/L de BA y sus combinaciones con AIA en el cuarto subcultivo de multiplicación de 'Dwarf Cavendish', 'Giant Cavendish' y 'Poyo'

Variedad	Tratamientos (mg/L)	Número de brotes (brotes/explante)	Coefficiente de multiplicación
'Dwarf Cavendish'	Control (MS)	1.04c	1.08d
	3 BA	2.54b	2.37bc
	3 BA + 0.2 AIA	3.25ab	2.50bc
	3 BA + 0.6 AIA	2.91ab	2.87ab
	4 BA	2.45b	2.20c
	4 BA + 0.2 AIA	3.45a	3.16a
	4 BA+ 0.6 AIA	2.41b	2.20c
	ES	0.12	0.099
'Giant Cavendish'	Control (MS)	1.08c	1.04c
	3 BA	1.95b	1.70b
	3 BA + 0.2 AIA	2.75a	2.20a
	3 BA + 0.6 AIA	2.25ab	2.12ab
	4 BA	1.95b	1.75b
	4 BA + 0.2 AIA	2.41ab	2.0ab
	4 BA+ 0.6 AIA	2.29ab	2.0ab
	ES	0.10	0.071
'Poyo'	Control (MS)	1.11c	1.05d
	3 BA	2.19b	1.88c
	3 BA + 0.2 AIA	3.25a	2.72ab
	3 BA + 0.6 AIA	2.19b	2.08c
	4 BA	3.44a	2.80a
	4 BA + 0.2 AIA	2.75ab	2.30bc
	4 BA+ 0.6 AIA	3.0ab	2.91a
	ES	0.11	0.071

Medias con diferentes letras son significativamente diferentes a $p < 0.05$.
ES error estándar

Fecha de recibido: 17 abr. 2010
Fecha de aprobado: 21 jun. 2010