

Evaluación de la metodología para la multiplicación *in vitro* de plátano *Musa sp.*

Evaluation of the methodology for the multiplication *in vitro* of banana *Muse sp.*

Autores: Enidia Téllez, Loexis Rodríguez y Karen Alvarado.

Institución: Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz, El Salvador.
Guantánamo.CP.99500.

Telef: (021) 82206 – 82207 - 82209 **E mail:** enidia@cdm.gtmo.inf.cu

Resumen.

El trabajo se desarrolló en el Centro de Desarrollo de la Montaña localizado en el municipio El Salvador, en el periodo entre Abril/2009- Noviembre/2010. Con el objetivo de lograr la multiplicación *in vitro* de plátano (*Musa sp*) se realizaron experimentos en las fases de la micropropagación. Los resultados obtenidos en la desinfección de los ápices de plátano se logró con doble desinfección con hipoclorito de sodio. El medio de establecimiento con las sales MS (1962), 2 mg. L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina, 0.23 mg.L⁻¹ de Ácido indolbutirico. El balance de citoquininas/auxinas en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de ápices de plátano de 4.0 mg.L⁻¹ 6 BAP y 0.65 mg.L⁻¹ Ácido 3 indolacético, alcanzo la mayor tasa de multiplicación con un promedio de 4.5 brotes/explantes .El enraizamiento *ex vitro* y aclimatización de las vitroplantas se logró en el sustrato de suelo: humus de lombriz (2:1) porcentaje supervivencia 95 % y altura 4.45 cm.

Palabras clave: micropropagación *in vitro*, enraizamiento *ex Vitro*.

Abstract.

The work was developed in the Center of Development of the Mountain located in the municipality El Salvador, in the period among April / 2009 - Noviembre/2010. With the objective of achieving the multiplication in banana *vitro* (*Muse sp*) they were carried out experiments in the phases of the micropropagation. The results obtained in the disinfection of the banana apexes were achieved with double disinfection with hipoclorito of sodium. The means of establishment with the salts MS (1962), 2 mg. L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina, 0.23 mg.L⁻¹ of Acid indolbutirico. The citoquininas/auxinas balance in the means of cultivation for the multiplication *in vitro* of apexes of banana of 4.0 mg.L⁻¹ 6 BAP and 0.65 mg.L⁻¹ Acid 3 indolacético, I reach the biggest multiplication rate with an average of 4.5 brotes/explantes. The enraizamiento former *vitro* and acclimatization of the vitroplantas was achieved in the floor sustrato: worm humus (2:1) percentage survival 95% and height 4.45 cm.

Key words: micropropagación *in vitro*, *ex vitro* enraizamiento.

Introducción.

Los bananos y plátanos representan el cultivo frutícola número uno en el mundo, tanto en términos de producción, alrededor de 98 millones de toneladas, como de comercio, valorado en más de US \$ 4306 millones (FAOSTAR, 2007).

El plátano ha sido usado por el hombre como alimento desde hace miles de años. Este cultivo a incrementado su valor social y económico, lo que implica la necesidad de mejorar el rendimiento y calidad, mediante la introducción de tecnologías de producción eficientes. (Martínez *et. al.*, 2004).

En el uso de las técnicas de cultivo de tejidos en la micropropagación clonal *in vitro* de musáceas, ha permitido la producción masiva de plantas sanas, libres de hongos, nematodos, bacterias y además la multiplicación rápida de genotipo de gran importantes económica en áreas relativamente pequeñas, esto ha permitido tener poblaciones uniformes con alto rendimiento por hectárea. (Orellana ,1998).

Los bananos y plátanos son hoy en Cuba y en el ámbito internacional, uno de los cultivos en los cuales más se han aplicado las técnicas biotecnológicas. En estos momentos se hace imprescindible la recuperación de este cultivo en la montaña, por los problemas que presenta la semilla, mala calidad (infestada por plagas y enfermedades) y la cantidad no supe los niveles productivos. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente este trabajo estuvo encaminado a evaluar la metodología para la multiplicación *in vitro* de plátano *Musa sp.*

Materiales y Métodos.

La investigación se desarrolló en el Centro de Desarrollo de la Montaña, localizado en Limonar de Monte Ruz, municipio El Salvador ubicado a 420 msnm en el macizo Montañoso Nipe-Sagua-Baracoa durante el periodo de Abril/2009 - Noviembre/2010.

El instrumental utilizado en el manejo del material vegetal se esterilizó en estufa a 180°C durante 150 minutos, las operaciones de inoculación y transferencia se realizaron en una cabina de flujo laminar horizontal FASTER, donde el instrumental se sumergió en etanol al 90% y se flameó con mechero de gas.

Los medios de cultivo se esterizaron en autoclave a 121°C y 1.2 Kg.cm⁻² de presión durante 20 minutos, previo a este proceso el pH del medio se ajustó a 5,7 ± 0.01. Para los experimentos de establecimiento se utilizaron tubos de cultivo (120 x 20 mm) con 5 mL de medio de cultivo en cada caso. Sin embargo los experimentos de multiplicación se realizaron en frascos de cultivo de vidrio de 250 mL de capacidad con 25 mL de medio de cultivo solidificado (6.0 g.L⁻¹ de agar técnico No. 3). Cada tratamiento contó de 20 repeticiones.

El material vegetal se incubó en un cuarto de incubación de luz natural y artificial con lámparas fluorescentes para el control del fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de aproximadamente 3000 a 4000lux (37.5–50.0µmol.m⁻².s⁻¹), la temperatura de 27 ± 2°C y la humedad relativa de 75-85 %.

Análisis experimental y estadístico empleado

Para el trabajo a nivel de laboratorio y casa Verde el diseño empleado fue completamente aleatorizado. En el procesamiento estadístico de los resultados se emplearon las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y el Test Levene para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos respectivamente. De cumplirse estos supuestos, se utilizaron las pruebas paramétricas de Análisis de Varianza (ANOVA) y Tukey HSD. En todos los casos se utilizó el procesador estadístico Statgraphic Plus versión 5.1 y para la graficación de los resultados el Microsoft Excel 2000.

Fase de establecimiento

Efecto de diferentes procedimientos para la desinfección de los ápices de plátano. Como material se utilizó semilla que fueron cultivadas de forma aislada en casa de cristal, desinfectados superficialmente con detergente.

El procedimiento se realizó según lo propuesto por la metodología de Orellana *et. al.*, (1994) (Testigo) (Tabla 1). Los explantes fueron subcultivados en un medio de que contiene las sales MS (1962) suplementados por las vitaminas Morell ,2 mg. L⁻¹ de 6-BAP, 0.23 mg.L⁻¹ de AIB, gelificado de 6 g. L⁻¹ de agar, 30 g / L⁻¹ de sacarosa y pH de 5.5-5.8.

Tabla 1. Diferentes procedimientos para la desinfección del los ápices de plátano.

Tratamientos	Detergente 1% /	NaClO (5%)	NaClO(2.5%)
I (Testigo)	5 min	-	10min
II	5 min	10 min	15 min
III	5 min	15 min	20 min

Muestreo y evaluación.

A los 10 días de iniciado el cultivo *in vitro* se evaluó el porcentaje de contaminación y el porcentaje de explantes muertos. La contaminación en el caso de los hongos se evaluó a través de la presencia de micelio y para bacterias a través de los exudados presentes en el explante y/o en la base de este. Como criterio de supervivencia se consideraron los explantes viables y no contaminados. Este indicador se evaluó a los 28 días de iniciado el cultivo. Cada tratamiento contó con 20 repeticiones Las variables que se evaluaron fueron:

- Porcentaje de supervivencia (%)(yemas brotadas y no contaminadas)
- Porcentaje de contaminación (%)(yemas con presencia de hongos y/o bacterias)
- Porcentaje de fenolización (%).(yemas necrosadas por exudados fenólicos oxidados)
- Inicio de la brotación (días).

Fase de multiplicación

Efecto del balance de citoquininas / auxinas en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de ápices de plátano.

A continuación se detallan los tratamientos evaluados para la proliferación de brotes en el clon de plátano macho.

Tabla 2. Tratamientos empleados en la fase multiplicación *in vitro* de ápices de plátano.

Tratamientos	Concentración de reguladores del crecimiento	
	6- BAP (mg.L ⁻¹)	AIA (mg.L ⁻¹)
I (Testigo)	4.0	-
II	4.0	0.65
III	4.0	1.0
IV	4.0	1.5

Muestreo y evaluación.

Las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas en procedimientos generales. Se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento. A los 28 días de cultivo se evaluó la longitud de brotes (cm) y el número de brotes por explante.

Fase de enraizamiento *ex vitro* y aclimatización

Efecto de diferentes sustratos en el enraizamiento *ex vitro* y aclimatización de las vitroplantas de plátano.

Para el enraizamiento *ex vitro* y aclimatización de las vitroplantas de plátano se utilizaron diferentes sustratos. A continuación se detallan los tratamientos.

Tratamiento 1. Suelo: M.O. (humus de lombriz) (3:1)

Tratamiento 2. Suelo: M. O (humus de lombriz) (2:1)

Tratamiento 3. Suelo: M.O. (humus de lombriz (1:1) (Testigo)

La supervivencia de las plantas se evaluó a los 7 días. Al final de la fase de climatización (45 días), se determinaron los siguientes indicadores morfológicos de calidad de las plántulas: longitud del tallo (cm.), número de hojas por planta y el diámetro del tallo (cm.). Se evaluaron un total de 30 plantas por tratamientos.

Resultados y discusión.

Fase de establecimiento

Efecto de diferentes procedimientos para la desinfección de los ápices de plátano.

En la Figura 1 se muestran los resultados de la desinfección de los ápices de plátano en el establecimiento *in vitro*. En los diferentes tratamientos, se observó una disminución de la supervivencia de las yemas en la medida que aumentó el tiempo de exposición de los explantes a los mismos. El tratamiento de doble desinfección con hipoclorito al 5 y 2.5 % con 10 y 15 minutos de exposición respectivamente fue el mejor tratamiento pues logró un mayor porcentaje de supervivencia, menor porcentaje de contaminación y pérdidas por fenolización. Los resultados con este tratamiento superan al propuesto por Orellana (1994) que consiste de una simple desinfección con hipoclorito al 2.5 % por 10 minutos, el incremento de la duración del tratamiento de desinfección es causante del decrecimiento en la habilidad de proliferación. Con relación al inicio de la brotación no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2).

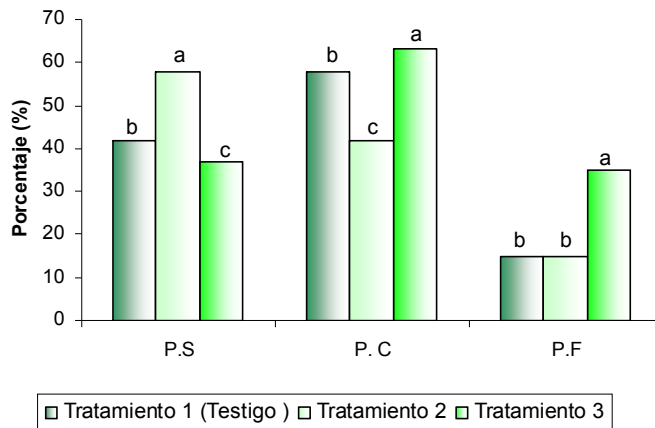


Figura 1. Efecto de los diferentes procedimientos de desinfección de los ápices plátano en el porcentaje de supervivencia, contaminación y fenolización, a los 28 días de cultivo. Los datos representan las medias para N=20. Medias con letras desiguales difieren significativamente. ANOVA simple para $p < 0.05$; Duncan para $p < 0.05$ para cada variable de manera independiente: I (NaClO 2.5% 10min); II (NaClO 5% 10min , NaClO 2.5% 15 min), III (NaClO 5% 15min, NaClO 2.5% 20 min.).

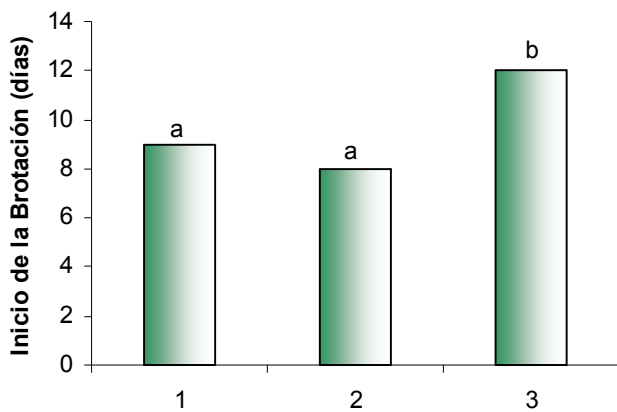


Figura 2. Influencia de los diferentes procedimientos de desinfección en el inicio de la brotación de ápices de plátano. *Letras distintas difieren estadísticamente* ($p < 0.05$). Medias con letras desiguales difieren significativamente. ANOVA simple para $p < 0.05$; Duncan para $p < 0.05$ para cada variable de manera independiente: 1 (NaClO 2.5% 10min); 2 (NaClO 5% 10min, NaClO 2.5% 15 min), 3I (NaClO 5% 15min, NaClO 2.5% 20 min.).

Canchignia *et. al.*, (2004), propone la desinfección 20 % de Hipoclorito de sodio durante 10 minutos y 1 % de bicloruro de mercurio durante 5 minutos de plátano variedad Barragante, con porcentaje de supervivencia de 100 %.

Dos Santos *et. al.*, 2002; utilizan para la desinfección de embriones de banano el nitrato de plata al 0.5% por 10 minutos seguido de una solución de hipoclorito de sodio 5% por 5 minutos, con resultados satisfactorios.

Efecto del balance de citoquininas / auxinas en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de ápices de plátano.

En la Tabla 5 observamos que en la variable número de brotes presento diferencias estadística entre el testigo y el resto de los tratamientos, siendo el tratamiento suplementado con 4.0 mg.L⁻¹ BAP y 0.65 mg.L⁻¹ AIA, en que se alcanzo la mayor tasa de multiplicación con un promedio de 4.50 brotes por explantes con respecto al tratamiento 1 (4.0 mg.L⁻¹ BAP). Existiendo un comportamiento similar entre los tratamientos tres y cuatro. Mientras que

para la longitud de brotes se presento diferencias significativas para los tratamientos en estudio. El tratamiento 4 fue el que mejor respuesta presento con respecto a los demás tratamientos con un promedio de 2.99 centímetro de longitud por brotes, pero lo más importante en esta fase es la obtención de brotes múltiples y no la longitud de estos, por lo que se hace necesario buscar un balance óptimo entre citoquininas y auxinas, para que se logre mayor coeficiente de multiplicación con un tamaño óptimo de los explantes.

Tabla 5. Resultados del balance de citoquininas/auxinas en la fase de multiplicación en ápices de plátano en las variables evaluadas.

Tratamientos	Número de brotes por explantes	Longitud de brotes
4.0 mg/l BAP	3.0 b	0.93 b
4.0 mg/l BAP+ 0.65 mg/l AIA	4.50 a	2.65 a
4.0 mg/l BAP+1.0 mg/l AIA	4.10 a	2.75 a
4.0 mg/l BAP+1.6 mg/l AIA	4.10 a	2.99 a
M.G±ES	3.92±0.01	2.33±0.01

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente ANOVA simple, para $p < 0.05$, según la prueba de rango de múltiples de Duncan. $p < 0.05$. (Para cada una de las variables que se evaluaron.)

En la micropropagación de plátanos y bananos se emplea el 6- BAP casi como la única citoquinina en dosis desde 3 - 22 μ M (Rodríguez *et. al.*, 2004), en esta misma especie Orellana (1998) no logró proliferación de brotes en ausencia de citoquininas. No obstante el papel determinante de las citoquininas en esta fase, en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes. Uno de los posibles efectos de las auxinas en la Fase II es anular el efecto depresivo acumulado de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos.

El balance auxinas- citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de micropropagación. Sin embargo, es necesario tener cuidado en el manejo de los reguladores del crecimiento en esta fase, ya que con el empleo continuado de altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo se puede inducir la formación de yemas adventicias (Evans y Bravo, 1985 descrito en Orellana, 1998), lo cual representa un inconveniente dentro del proceso de propagación.

En esta fase Daniels (1999). recomendó para el cultivo de plátano fruta FHIAV-01 una dosis de 3 mg. L⁻¹ 6-BAP sin adición de auxina. Orellana (1998) encontró para el cultivar de banano Gran Enano, alta coeficiente de multiplicación, con el uso de 3 mg. L⁻¹ 6-BAP y 0.65 mg.L⁻¹ de AIA.

Fase de enraizamiento *ex vitro* y aclimatización.

Efecto de diferentes sustratos en el enraizamiento *ex vitro* y aclimatación de las vitroplantas de plátano.

En Tabla 6 se observa que la variable altura de plantas presentó diferencia significativa entre tratamientos, siendo el sustrato Suelo: humus de lombriz (3:1) y Suelo: humus de lombriz (2:1) los de mejores resultados. Pero estadísticamente estos dos tratamientos son iguales

con promedios de 6.10 y 6.40cm respectivamente. Pero fueron superior al tratamiento Suelo: humus de lombriz (1:1) quien alcanzo promedio de 3.05cm de longitud. En lo que respecta, a las variables números de raíces para el tratamiento 1 y 2 se obtuvo respuestas similares, no así para el tratamiento 3. De la Noval *et. al.*, 1997 encontraron efectos positivos sobre el establecimiento y desarrollo de las vitroplantas de banano (*Musa sp.*) cuando se utilizó como sustrato la combinación suelo: estiércol vacuno (1:1). La utilización de suelo: H.L (2:1) para el caso del porcentaje de supervivencia fue el mejor tratamiento con 95.6%.

Tabla 6. Resultados de los diferentes sustratos en la aclimatización de vitroplantas de plátano en las variables evaluadas.

Sustrato	A.P	N.R	P.S
Suelo: M.O.(H.L) (3:1)	6.10 a	4.40a	84.31 b
Suelo: M.O.(H.L) (2:1)	6.40 a	4.50a	95.66 a
Suelo: M.O.(H.L) (1:1) (T)	3.05 b	2.10b	47.95 b
M.G±EE	3.85±0.05	3.33±0.01	

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente ANOVA: $p < 0.05$, según la prueba de rango de múltiples de Duncan, $p < 0.05$ Para cada una de las variables que se evaluaron

Leyenda:

A.P. Altura de la planta (cm).

N.R. Número de raíces.

P.S. Porcentaje de supervivencia (%).

En la metodología propuesta por Orellana (1994) las plántulas se cultivan sobre un sustrato formado por una mezcla de tierra, arena de río lavada y materia orgánica en una proporción de 2:1:1, se logra porcentajes de supervivencia mayores de un 90%.

La utilización de humus indican que esta solución puede actuar como fuente de nutrimentos o en la activación de procesos fisiológicos que inducen a una brotación precoz y mayor crecimiento Martínez *et. al.*, (2004), el modo de acción del humus se desconoce, pero sobre la base de los resultados obtenidos se puede inferir que no solo actúa como fuente de nutrientes, sino además es posible que tenga la capacidad de activar mecanismos fisiológicos que permitan la expresión del vigor de las plantas en su máxima expresión.

La acción de diversos mecanismos relacionados con la materia orgánica, donde los microorganismos existentes contribuyen con la mineralización e inmovilización de nutrimentos, pueden estar relacionados con múltiples procesos biológicos en los cuales interactúan paralelamente raíces y compuestos del suelo, dando origen a minerales en formas disponibles para las plantas. Esto refleja la gran importancia de estos procesos y la presencia de los microorganismos en el suelo; por cuanto el incremento de la cantidad y actividad de los mismos, está en relación directa con la incorporación de compuestos orgánicos al suelo (Martínez, *et. al.*, 2004).

Conclusiones.

- La desinfección de los ápices de plátano necesitaron una doble desinfección con hipoclorito de sodio al 5 y 2.5 % durante 10 y 15 minutos respectivamente.
- El balance de citoquininas / auxinas en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de ápices de plátano más efectivo fue de 4.0 mg.L⁻¹ BAP y 0.65 mg.L⁻¹ AIA, en

que se alcanzó la mayor tasa de multiplicación con un promedio de 4.50 brotes por explantes.

- El enraizamiento *ex vitro* y aclimatización de las vitroplantas se logró en el sustrato de suelo y humus de lombriz (2:1) con un porcentaje supervivencia de un 95 % y altura de 4.45 cm.

Referencias Bibliográficas.

- Agramonte, D. (1998). Aclimatización. En J.N. Pérez Ponce (ed). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. Villa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas.
- Canchignia, F. & Ramos, L. (2004). Micropropagación de plátano variedad Barragante. Recuperado de <http://www.visagesoft.com>.
- Daniels, D. (1999). *Micropropagación del clon de plátano híbrido FHIA- 21 (AAAB) y sus somaclones*. UCLV, Santa Clara.
- De la Noval, B.; Hernández, M. I. y Hernández, J. C. (1997). Utilización de las micorrizas arbusculares en la adaptación de vitroplantas de banano (*Musa sp.*): Dosis y cepas de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y combinaciones de sustratos. *Cultivos Tropicales*, 18(3), p. 5-9.
- Dos Santos, N; De Oliveira , S; De Oliveira. R. (2002). Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de diplóides de bananeira obtidas a partir de cultura de embriões. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(1).
- FAOSTAT. (2007). FAO Statistics Division. Helping to build a world without hunger (on line). Recuperado de <http://faostat.fao.org/site/340/DesktopDefault.aspx?PageID=340>
- Gómez R.; Pérez, J.; Orellana Pérez, P.; Agramonte, D. y de Feria, M. (2002). Estado de la práctica de la biotecnología de musáceas en Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas.
- Martínez, G; Tremont, O. y Hernández, J. (2004). Manual Técnico para la Propagación de Musáceas. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. CENIAP HOY*, (4).
- Orellana, P. A. (1994). *Tecnología para la micropropagación in vitro de clones de Musa sp.* Universidad Central de Las Villas, Santa Clara.
- Orellana, P. (1998). Introducción a la propagación masiva. En: Pérez, J.N., (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. En (Ed) Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara.
- Rodríguez, A. J; Rodríguez, A; Quintero, S; Torres, M. A y Fundora, Z. (2004). Influencia de los medios de cultivo en la micropropagación de plátano (*Musa spp.*) y malanga (*Xanthosoma sagittifolium*, Schott). *Cultivos Tropicales*, 25(1), p. 23- 26.

Fecha de recibido: 24 dic. 2010
Fecha de aprobado: 21 feb. 2011