Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2003, 20: 468-477

Multiplicación *in vitro Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal[1]

In vitro Musa spp. multiplication in the temporary immersion system

M. Colmenares[2] y C. Giménez[2]

Resumen

El empleo de medios líquidos en protocolos de propagación masiva se ha convertido en una necesidad para abaratar los costos de producción de plantas obtenidas *In vitro*, pero es sólo hasta el desarrollo de los sistemas de inmersión temporal cuando se vislumbra su potencial aplicación. En musáceas la inmersión temporal ha permitido aumentar la eficiencia de la propagación masiva vía inducción de brotes, embriogénesis somática secundaria y en la germinación de los embriones. Sin embargo, estas técnicas apenas se están comenzando a escalar a nivel industrial. El objetivo de esta investigación es estudiar la posibilidad de aplicar la inmersión temporal como método para la multiplicación masiva *In vitro* de musáceas en Venezuela. A fin de reducir los costos en la fase de iniciación, se disminuyó a 7 días el tiempo para la introducción *In vitro* de plantas provenientes de campo y se empleó medio líquido sin hormona, sustituyendo esta por agua de coco al 15%. Los índices de multiplicación promedios obtenidos para el banano cv. Williams fueron 8,4 y 2,4 y para Plátano Hartón los valores obtenidos fueron 11,2 y 4,3 para sistemas de inmersión temporal (20 min cada 4 horas) y medio de cultivo sólido respectivamente. Adicionalmente, las evaluaciones sobre los tiempos de inmersión de 2 y 20 min. produjeron índices de multiplicación semejantes en cv. Williams. Estos resultados demuestran que la inmersión temporal es una técnica que puede ser aplicada para mejorar sustancialmente los índices de multiplicación en musáceas respecto a los protocolos convencionales usados en Venezuela.

Palabras clave: Medio de cultivo líquido, RITA, *Musa*, yemas axilares, inducción de brotes.

Recibido el 23-9-2002 ● Aceptado el 14-3-2003

1 Este trabajo fue cofinanciado por el Concejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES), Proyecto No. 341-00 y el FONACIT Pasantía Postdoctoral 99000098.

2 Laboratorio de Biotecnología Vegetal de La Universidad del Zulia (BioVeLUZ), Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Apartado postal 10488, Maracaibo (4002) Venezuela. Fax: (58 261) 7598078 e-mail: cagimenez68@hotmail.com, mcolmena@msn.com

Abstract

In order to reduce the costs of *In vitro* plants production, the use of a liquid propagation medium is completely necessary but it was not until recently that temporary immersion in liquid culture could really be used for massive propagation of *In vitro* plants. In *Musa ssp.*, temporary immersion has increased the multiplication index of massive propagation protocols via organogenesis or secondary embryogenesis, although, this technique has not been used on a scale that would permit massive production of *Musa In vitro* plants. The main objective of this research was to study the possibilities of applying temporary immersion systems for *In vitro* massive propagation of *Musa* in Venezuela. To reduce costs and time for *In vitro* introduction of field material, the explants initiation time was reduced to 7 days, and a liquid medium without hormones and coconut milk (15%) was used. The average multiplication indexes from the banana cv. Williams were 8.4 and 2.4, the Horn Plantain values were 11.2 and 4.3 for temporary immersion and solid medium respectively. Additionally no significant differences were found between 2 and 20 min temporary immersion times. These results demonstrate that temporary immersion could be used to improve the *Musa* propagation indexes of conventional protocols applied in Venezuela.

Key words: Liquid culture medium, RITA, *Musa*, axillary buds, shoot induction.

Introducción

Los plátanos y bananos representan gran parte de la alimentación diaria para más de 400 millones de personas en más de 100 países del trópico y subtrópico. La utilización del plátano y banano como alimento ha venido incrementando su valor económico, lo que implica la necesidad de mejorar sus rendimientos, calidad y fomentar su rápida multiplicación mediante el desarrollo y transformación de tecnologías (12).

En base a los indicadores económicos manejados por la UPEB (1996) y a las condiciones agroecológicas óptimas para este cultivo, nuestro país tiene una evidente ventaja competitiva (16). Sin embargo, en Venezuela la aplicación de técnicas biotecnológicas para el mejoramiento de la agricultura se ha visto limitada por los altos costos de transferencia de la tecnología desde el laboratorio al campo y por la falta de información e interés de los productores agropecuarios ante la posibilidad de usar la biotecnología como una herramienta para aumentar los niveles de producción (4).

La semi-automatización de los sistemas de propagación *In vitro* de plantas es un paso fundamental para la reducción de los costos, al respecto el cultivo en medio líquido representa una alternativa para la reducción de los costos operativos en la micropropagación de plantas (13). Sin embargo, se han reportado efectos

negativos como la hiperhidricidad o dificultades en la aclimatación de plantas propagadas en medios de cultivos líquidos estáticos (5). Por ello se han creado los sistemas para la inmersión temporal (SIT) de los explantes, que permiten el empleo de medios de cultivo líquido sin efectos colaterales. Sobre la base de estos principios, se han construido una serie de aparatos como los descritos por Aitken-Christie y Davis (1988), quienes reportan el aumento en número y peso de brotes de Amelanchier x grandiflora Rehd, en envases de 7 litros.

Los SIT además de solucionar las dificultades de los cultivos estáticos, despliegan la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *In vitro*, permiten mayor facilidad de escalado y aumentan los índices de multiplicación, desarrollo y productividad del material propagado (13). Los SIT pueden aplicarse en la propagación masiva de plantas elites, mediante organogénesis o embriogénesis somática, para incrementar los coeficientes de multiplicación en comparación con las formas convencionales de propagación *In vitro* (cultivo en medio sólido o líquido semi-sumergido o sumergido) (6). En Venezuela, no existen experiencias en la aplicación de algún tipo de SIT, en la multiplicación de ningún cultivo.

En función de la necesidad existente de aumentar la multiplicación de musáceas comerciales, se plantea explorar nuevas tecnologías que abaraten y estimulen el uso de plantas obtenidas *In vitro* en los campos, mediante la reducción de los costos de producción por planta, para lo cual es necesario aumentar los índices de multiplicación (IM) y disminuir los costos de los medios de cultivo. En este sentido, esta investigación se planteó los siguientes objetivos: a) Ensayar el SIT mediante la instalación de los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA), b) Evaluar el efecto de la inmersión temporal sobre el índice de multiplicación y peso fresco de brotes de Plátano Hartón (AAB) y cv. Williams (AAA), como representantes de musáceas triploides comerciales en Venezuela. c) Evaluar el efecto del tiempo de inmersión en la etapa de multiplicación *In vitro* del banano cv. Williams y d) Evaluar los índices de multiplicación en RITA de algunos cultivares y especies de *Musa* spp.

Materiales y métodos

Material Vegetal

Se iniciaron cultivares y especies silvestres de *Musa* spp. a partir de cormos obtenidos de campos de producción en el estado Aragua, Zulia y del Banco de Germoplasma in vivo de musáceas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (cuadro 1).

Inducción de yemas axilares en medio sólido y líquido en SIT.

Se inició el establecimiento de un banco de germoplasma *In vitro* de plantas de plátanos y bananos elites seleccionados según la calidad del racimo que presenta la planta madre del cultivar que se extrajo el hijo (cuadro 1). En este ensayo se utilizó como ma-

Cuadro 1. Especies y cultivares de Musa spp. introducidos in vitro mediante inducción de brotes a partir de cormos recolectados en diferentes zonas del país

Especie o cultivar	Genoma	Origen del material
Banano cv. Williams subgrupo Cavendish	AAA	Fincas de producción Edo. Aragua
Plátano Hartón	AAB	Estado Zulia (Sur del Lago). Municipio Francisco Javier Pulgar
Pisang Berlin	AA	
Pisang Mas	AA	Banco de Germoplasma de Musáceas.
Musa acuminata Sub especie Zebrina	AA	Facultad de Agronomía UCV
Musa balbisiana	BB	

terial vegetal el banano *Musa* (AAA) cv. Williams subgrupo Cavendish y *Musa* (AAB) cv. Plátano Hartón.

Para el establecimiento del cultivo *In vitro* se procedió según la metodología de inducción de brotes axilares en medio sólido (8, 18). En la fase de iniciación se redujo el tamaño de los ápices hasta aproximadamente 3 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro y se colocaron en medio de iniciación (MI) líquido (cuadro 2). A fin de reducir los tiempos para la introducción *In vitro* de plantas de campo y los costos de propagación en la

Cuadro 2. Medio para la iniciación (MI) e inducción de brotes (MIB) axilares en micro cormos de Musa spp.

	MI	MIB
Murashige and Skoog (1962) (11)	1X	
Cisteina	60 mg/l	
Ácido Ascórbico	100 mg/l	
Mio-inositol	100 mg/l	
BA	0 mg/l	5 mg/l
Agua de Coco	15%	0%
Sacarosa	40 g/l	30 g/l
pH	5,8	
Vitaminas de Morel y Wetmore (1951) (10)		
Ácido Pantoténico	1 mg/l	
Biotina	0,01 mg/l	
Tiamina	1 mg/l	
Agente solidificante		
Gell Gum (Research Organics)	0 g/l	3 g/l

fase de iniciación, se empleó un medio líquido modificado sin hormona, sustituyendo esta por agua de coco al 15% (cuadro 2) y se cultivaron los explantes durante 7 días de acuerdo a la metodología de Colmenares y Giménez (2001). Transcurridos los 7 días se eliminaron los explantes contaminados y los que sobrevivieron se utilizaron directamente en la fase de multiplicación en medios sólido y líquido en RITA® (7).

Luego de la fase de iniciación de 7 días en medio líquido, se procedió a la fase de multiplicación en medio cultivo para la inducción de brotes (MIB) (cuadro 2) sólido y líquido en RITA (15). Se usaron explantes seleccionados al azar que fueron reducidos hasta un peso fresco promedio de 1 ± 0,3 g, inoculando 3 micro cormos por envase. Cada micro cormo se dividió longitudinalmente en dos partes, para romper la dominancia apical y promover la multiplicación masiva. Los explantes fueron cultivados con una inmersión de 20 minutos cada 4 horas. Se evaluó el peso fresco y el índice de multiplicación clonal (IM) que fue calculado según la siguiente ecuación (3): IM = N° Brotes $_{(30\ días)}$ / N° de plantas.

Evaluación de Tiempos de Inmersión

Para evaluar el efecto del tiempo de inmersión en los índices de multiplicación del banano cv. Williams se ensayaron 2 y 20 min. de inmersión cada 4 h, durante 30 días de cultivo.

Índices de Multiplicación en *Musa* spp. en RITA

Se evaluó el índice de multiplicación en sistema de inmersión temporal RITA, de diferentes representantes del género *Musa*, a saber: banano cv. Williams subgrupo Cavendish, Pisang Berlin, Pisang Mas, *Musa* acuminata Sub especie Zebrina y *Musa* balbisiana a partir de cormos de campo (cuadro 1).

Todos los ensayos tuvieron una duración de 30 días a una temperatura de 28 3 °C, a una intensidad de 50 M m^{-2} s^{-1} de luz fluorescente blanca continua.

Los experimentos se diseñaron comparando el medio de inducción de brotes en sólido con respecto al medio líquido en SIT. Las mediciones del IM y peso fresco se hicieron luego de 30 días de cultivo. A los datos generados se les aplicó un análisis estadísticos ANOVA de una vía usando el software STATISTICA para Windows ver. 5.5 (14). Todos los ensayos fueron completamente aleatorizados, con cinco repeticiones para un total de 15 explantes por tratamiento, para así asegurar la homogeneidad de la varianza y poder determinar la significación estadística de los tratamientos ensayados mediante una prueba paramétrica de múltiples rangos de Duncan (p 0,05).

Resultados y discusión

Inducción de yemas axilares en medio sólido y líquido en SIT.

Se determinó el efecto de la inmersión temporal sobre los índices de multiplicación y peso fresco en plátano y banano. Para cormos de banano cv. Williams (*Musa*, AAA), multiplicados *In vitro* con 5 mg/l de BA se obtuvo un índice de multiplicación de 8,4 en los SIT y 2,4

en medio de cultivo sólido; para Plátano Hartón (*Musa*, AAB) los valores obtenidos fueron 11,2 y 4,3 mediante SIT y en medio de cultivo sólido respectivamente (figura 1). Estos resultados fdemuestran que la aplicación de la inmersión temporal aumenta los índices de multiplicación en las musáceas comerciales estudiadas entre 2,6 a 3,5 veces más en Plátano Hartón y cv. Williams respectivamente, que el sistema de cultivo convencional en medio sólido bajo las condiciones de cultivo aplicadas en este trabajo.

Para bananos cv. Grand Nain (AAA) del subgrupo Cavendish multiplicados en 2,5 mg/l de BA, ha sido reportado un índice de multiplicación de 2,1 para medio sólido y 5,2 en SIT (3). Por otra parte, el uso de 5 mg/l de BA para la inducción de brotes de bananos del subgrupo Cavendish en medio de cultivo sólido produce un índice de multiplicación de 4,88 (8).

Para meristemos de banano FHIA-18, disectados en cuatro partes y cultivados en RITA, se obtuvo 60 brotes por meristemo, mientras que en medio sólido lograron obtener 12 brotes por explante inicial cultivado. Esto indica que los IM son dependientes del cultivar y del manejo inicial que se le haga al explante (17). En consecuencia, es muy probable que los valores de IM obtenidos en este trabajo aún no sean óptimos y que variando la frecuencia, el tiempo de inmersión y el manejo del explante sea posible lograr índices de multiplicación más elevados, inclusive utilizando una menor concentración de hormona, favoreciendo la estabilidad genética y reduciendo el costo por planta.

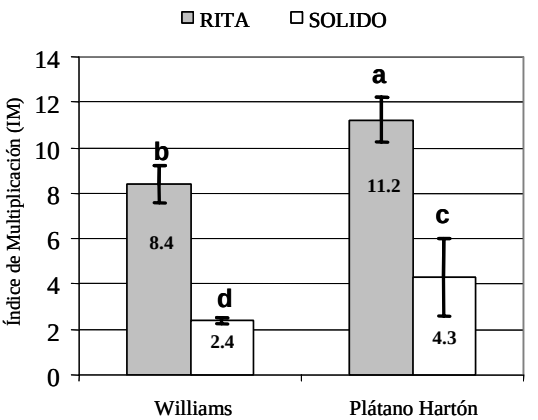

Figura 1. Efecto del cultivo en RITA y medio de cultivo sólido sobre el índice de multiplicación del banano cv. Williams (AAA) y Plátano Hartón (AAB), a partir de plantas de campo. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas según prueba de múltiples rangos de Duncan, p≤0,05. Los datos son promedios ± ES (n = 15).

Además, para el banano cv. Williams se obtuvo un mayor peso fresco por explante en SIT (19,9 g) que en medio de cultivo sólido (4,4 g). Este incremento en el peso fresco se correlaciona directamente con un incremento en el número de brotes (figuras 2 y 3 A-B). El peso fresco para el Plátano Hartón, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre el SIT (13 g) y el medio de cultivo sólido (11 g) (Figura 2 y 3 C-D), aunque el IM fue 2,6 veces mayor en SIT que en sólido. Esto es debido a que en banano cv. Williams los brotes presentan un mayor desarrollo vegetativo que los brotes de Plátano Hartón en el sistema de inmersión temporal RITA; en la fase de multiplicación del cv. Williams los brotes desarrollan abundantes hojas y raíces, aspecto que reduce las tasa de multiplicación. En este sentido, se han obtenido considerables incrementos en los índices de multiplicación en SIT utilizando paclobutrazol y ancymidol como inhibidores del crecimiento (2).

En bananos cv. Grand Nain (AAA) del subgrupo Cavendish cultivados en SIT también ha sido reportado un aumento de los valores de peso seco en comparación con medio sólido (3).

Evaluación de Tiempos de Inmersión

Con inmersiones de 2 min. cada 4h se obtuvo un IM de 7,5 y para 20 min. cada 4h un IM de 8. Estos IM no presentaron diferencias estadísticas.

Resultados semejantes han sido obtenidos en la evaluación de diferentes tiempos de inmersión en callos friables de Hevea brasiliensis: 1 min., 1 h, 12 h y 24 h, demostrando que el tratamiento de inmersión de 1 min. produjo mejores resultados; en los tratamientos de 1, 12 y 24 horas el desarrollo de los callos fue un 60% menor. El tiempo de inmersión afecta la tasa de respiración del tejido. La actividad superoxido dismutasa y la peroxidación de lípidos aumenta con la duración de la inmersión, de tal manera parece que el período de inmersión induce un sustancial estrés oxidativo (9).

Índices de Multiplicación de *Musa* spp. en RITA

En base a los índices de multiplicación clonal de diferentes especies y cultivares de *Musa* spp. cultivados en RITA, podemos señalar que los cultivares y especies de genoma acuminata responden mejor que el tipo silvestre de *Musa* balbisiana ensayado, en el que se obtuvo bajos índices de multiplicación (figura 4). Este es el primer reporte donde se compara la respuesta de diferentes genomas de *Musa* spp. multiplicados mediante cultivo en sistema de inmersión temporal.

En este trabajo reportamos los primeros resultados de la aplicación de la inmersión temporal en Venezuela, siendo nuestro laboratorio el pionero en el desarrollo de esta tecnología avanzada en el campo de la micropropagación masiva. Estos resultados demuestran la aplicabilidad de los SIT para la multiplicación de un rubro tan importante a nivel regional y nacional como son los plátanos y bananos.

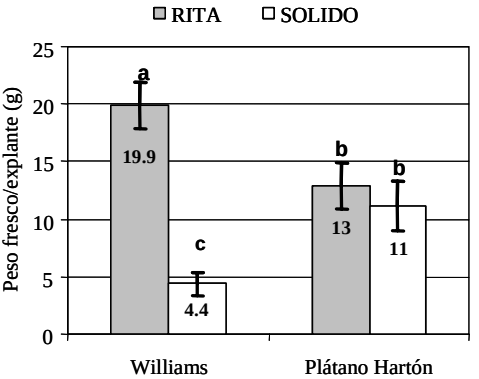

Figura 2. Efecto del cultivo en RITA y medio de cultivo sólido sobre el peso fresco por explante del banano cv. Williams (AAA) y Plátano Hartón (AAB), a partir de plantas de campo. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas según prueba de múltiples rangos de Duncan, p≤0,05. Los datos son promedios ± ES (n = 15)

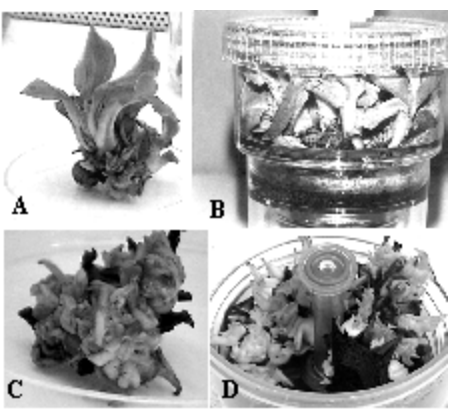

Figura 3. Desarrollo de brotes obtenidos mediante cultivo *in vitro* en RITA. A-B: cv. Williams *Musa* (AAA) y C-D: Plátano Hartón *Musa* (AAB). Luego de 30 días de cultivo en medio MIB, 20 min. de inmersión cada 4 h.

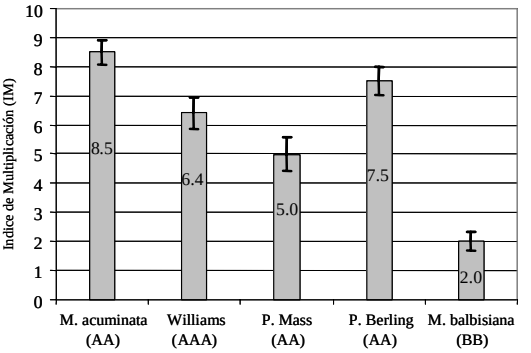

Figura 4. Índices de multiplicación de diferentes especies y cultivares de *Musa spp.* multiplicados en RITA (20 min. cada 4 h), iniciados a partir de cormos de campo. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas según prueba de múltiples rangos de Duncan, p≤0.05. Los datos son IM ± ES (n= 3-6).

Conclusiones

El sistema de inmersión temporal RITA, aumenta los índices de multiplicación entre 3,5 y 2,6 veces más que el sistema de cultivo convencional en medio sólido para el cv. Williams (AAA) y cv. Plátano Hartón (AAB) respectivamente.

En el sistema de inmersión temporal RITA el peso fresco por explante del cv. Williams es mayor que en el cv. Plátano Hartón.

El índice de multiplicación en tiempos de inmersión de 2 min. y 20 min. cada 4 h no presenta diferencias estadísticamente significativas para el cv. Williams.

Las musáceas que contienen genoma de M. acuminata responden mejor al cultivo *In vitro* en sistemas de inmersión temporal que la especie silvestre M. balbisiana bajo las condiciones de cultivo *In vitro* ensayadas en este trabajo.

Agradecimientos

Este trabajo fue cofinanciado por el Concejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES) Proyecto No. 341-00 y el FONACIT Pasantía Post doctoral 99000098. Agradecemos, al Dr. Oscar Hadad (Agronomía-UCV) por suministrarnos el material vegetal usado en esta investigación; a la Prof. Silvia León de Sierralta de la Facultad de Agronomía-LUZ, por su apoyo en los inicios de nuestro laboratorio y a la Dra. Eva de García (IBE-UCV) por ceder sus instalaciones para iniciar parte de esta investigación.

Literatura citada

1. Aitken-Christie, J. y H. E. Davies. 1988. Development of semi-automated propagation system. ActaHort 230: 81-87.

2. Albany, N. 2001. Efectos de los retardantes de crecimiento en la micropropagación de bananas en medios de cultivos líquidos en agitador orbital y sistema de inmersión temporal. Tesis de Maestría. Universidad Central de la Marta de Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba. 80 p.

3. Alvard, D. F. y C. Teisson. 1993. Comparation of methods of liquid medium for banana micropropagation. Plant Cell Tiss Org. 32: 55-56.

4. Bermudez, A. 1997. Problemas de la desvinculación de la investigación y la actividad productiva p 11-14. 1er Encuentro de productores agrícolas con la biotecnología. Fundacite Zulia.

5. Bhagyalakshmi y N. Singh. 1995. Role of liquid versus agar-gelled media in mass propagation and ex vitro survival in bananas. Plant Cell Tiss Org 41: 71-73.

6. Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), 1993. Recipiente con Inmersión temporal para cultivo de tejidos de plantas. Las principales ventajas del sistema Rita®. Actualización, 02 febrero 2003. URL: http://www.cirad.fr/produits/rita/es/interet.htm

7. Colmenares, M. y C. Giménez 2001. New strategies for shoot induction in *Musa*. IV Latin-American meeting on plant Biotechnology REDBIO 2001. 4 al 8 de Junio de 2001. Goiania-Goiás, Brasil.

8. Hardy, I. y E. García 1994. Micropropagación de bananos (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. YTON 55: 31-41.

9. Martre P., D. Lacan, D. Just y C. Teisson. 2001. Physiological effects of temporary immersion on Hevea brasiliensis callus. Plant Cell Tiss Org 67 (1): 25-35.

10. Morel, G. y R. H. Wetmore. 1951. Tissue Culture of Monocotyledons. Am J Bo 38:138-140.

11. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised mediun for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. Physiol Plant 15: 473-497.

12. Ortiz R 1993. Plantain and Banana research at the International Institute of Tropical Agriculture. HortScience 28 (9): 874-970.

13. Pérez-Ponce, J. N., G. A. Jiménez y P. D. Agramonte. 1998. Aumento de la Eficiencia en la Micropropagación. p. 179-191. En: Pérez Ponce, J. N (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Ediciones GEO: Vol. 1. Instituto de Biotecnología de Plantas (IBP). Santa Clara, Cuba.

14. StatSoft, Inc. 1999. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, URL: http://www.statsoft.comSTASOFT.

15. Teisson, C. 1997. RITA an apparatus for application of temporary immersions in plant tissues culture. Resúmenes: Técnicas avanzadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG´97. p 32.

16. Unión de Países Exportadores de Banano (UPEB) 1996. Perfil de la actividad Bananera en América Latina (Extracto del informe estadístico de la actividad bananera en América Latina de 1994). Info*Musa* 5 (1): 14-20.

17. Ventura, M. C., V. Medero, T. López, G. García, R. Morales y R. D. García. 1998. Manejo de los explantes en inmersión temporal, clon de banano FHIA-18. Resúmenes: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de Convenciones de la Habana-Cuba. p.64.

18. Vuylsteke, D. y E. De Langhe. 1985. Feasibility of *In vitro* propagation of bananas and plantains. Trop Agr (Trinidad) 62: 323-328.