

MICROPROPAGACIÓN DE *Musa* spp. (PLÁTANO var. MANZANO AAB) A PARTIR DE MERISTEMAS FLORALES

Gladys Molina*, María Vielma T.*,
Melangel Tacoronte* y Máximo Briceño**

RESUMEN

Los bananos y plátanos son rubros alimenticios de gran importancia económica en Venezuela, y han sido considerados como alimentos de elevado consumo nacional. Uno de los objetivos fundamentales de la tecnología de avance aplicada a la agricultura, es generar aumentos sustanciales en la producción y/o rendimiento de este rubro a través de nuevos enfoques, permitiendo la expansión de la superficie sembrada. El objetivo principal de la investigación es Micropropagar plantas de *Musa* spp. (Plátano var. Manzano AAB) a partir de meristemas florales masculinos. Esta investigación se realizó en seis etapas, empleando el medio de Murashige y Skoog (MS) en 1962 y de Schenk y Hildebrandt (SH) en 1986, con diferentes concentraciones hormonales y condiciones de cultivo. **Etapa I:** establecimiento de ápices de inflorescencias masculinas de 1,1 cm en MS1– control. **Etapa II:** inducción de primordios en MS modificado (MS2) a dos concentraciones de bencaminopurina (BAP: TI=1,5 y TII=3 mg l⁻¹) y control (MS1). **Etapa III:** expresión de primordios en medio SH + 3,2 µM BAP (MS3). **Etapa IV:** desarrollo y alargamiento de primordios en medio MS4 (MS +1,5 mg l⁻¹ ANA). **Etapa V:** enraizamiento de vástagos en medio ½ MS + 1 mg l⁻¹ ANA (MS5). **Etapa VI:** aclimatación de las plantas. Se observó que en *Musa* spp. (Plátano var. Manzano AAB) es posible obtener plantas a través de inflorescencia masculinas. La inducción de primordios de vástago se produjo en TI, TII y control. De acuerdo al análisis estadístico hay diferencias significativas entre el control, TI y los tratamientos TI y TII, indicando que la presencia de BAP es indispensable en el medio para inducir primordios de vástago.

Palabras Clave: *Musa*; inflorescencia; primordios; plátano.

* Ingeniero Agrónomo, Profesor y Asistente de Laboratorio, respectivamente. Universidad de Los Andes (ULA). Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro*. 5101.
E-mail: gjmr23@hotmail.com - mvielma1@ula.ve - tacoront@ula.ve

** Profesores. Instituto Politécnico Santiago Mariño. Estado Mérida. Venezuela.
E-mail: kantbrin@yahoo.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

MICROPROPAGATION OF *Musa* spp. (PLÁTANO var. MANZANO AAB) FROM FLORAL MERISTEMS

Gladys Molina*, María Vielma T.*, Melangel Tacoronte*
y Máximo Briceño**

SUMMARY

The Bananas and plantains are nutritional species of economic importance in Venezuela, and have been considered as nutriment national consumption. One of the main objectives of technologies applied to agriculture is to generate substantial increases in the production and/or efficiency of these species through new approaches, allowing the expansion of the seeded surface. The primary target of the investigation is Micropropagate plants of *Musa* spp. (var. manzano Banana AAB) from floral masculine meristems. This investigation was performed in six stages, using the medium of Murashige and Skoog MS in 1962 and Schenk and Hildebrandt SH in 1986, with different hormonal concentrations and conditions of culture. **Stage I:** establishment of apexes of masculine inflorescences of 1.1 cm in MS1-control. **Stage II:** induction of buds in modified MS (MS2) to two concentrations of benzilaminopurine (BAP: TI=1.5 and TII=3 mg l⁻¹) and control (MS1). **Stage III:** expression of buds in the medium SH + 3.2 µM BAP (MS3). **Stage IV:** development and extension of buds in medium MS4 (+1,5 MS mg l⁻¹ ANA). **Stage V:** rooting of offshoot in medium ½ MS+1 mg l⁻¹ ANA (MS5). **Stage VI:** acclimatization of the plants. It was observed that in *Musa* spp. (Plantain var. Apple AAB) is possible to obtain masculine inflorescences. The induction of buds of offshoots took place in TI, TII and control. According to the statistical analysis there are significant differences between the control, TI and the treatments TI and TII, indicating that the presence of BAP in the medium is required to induce offshoot buds.

Key Words: *Musa*; inflorescence; buds.

* Ingeniero Agrónomo, Profesor y Asistente de Laboratorio, respectivamente. Universidad de Los Andes (ULA). Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro*. 5101.
E-mail: gjmr23@hotmail.com; mvielma1@ula.ve; tacoront@ula.ve

** Profesores. Instituto Politécnico Santiago Mariño. Estado Mérida. Venezuela.
E-mail: kantbrin@yahoo.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

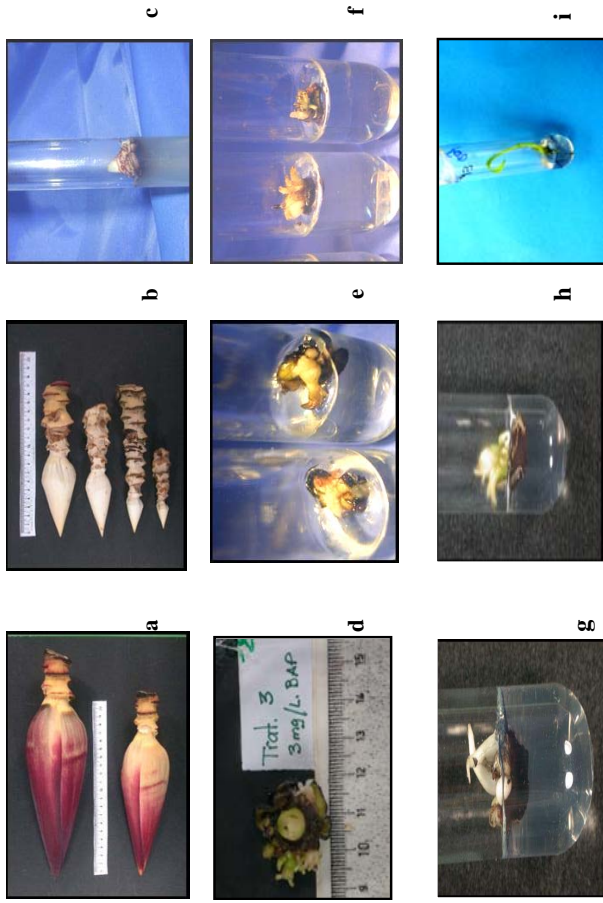
El cultivo de musáceas es de gran importancia debido a su valor nutritivo, donde destaca el contenido de carbohidratos (35%), que en parte son transformados a glucosa, sacarosa y fructosa durante la maduración, (6-7 % de fibra), (1-2% de proteína, potasio, magnesio, fósforo, calcio, hierro y vitaminas A y C), lo cual cubre las necesidades requeridas en la dieta básica de la población (Novak, 1992). Estudios de la FAO (1999), señalan que el grupo conformado por plátanos y cambures, conjuntamente con la leche, el trigo, y el arroz constituyen los cuatro alimentos más importantes del mundo. La misma fuente señala que por lo menos 400 millones de personas consumen el plátano y al cambur como alimentos básicos, siendo explotados por países en desarrollo en más de 8 millones de t/año.

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, han sido aplicadas en esta investigación para aumentar la propagación de plantas (“semillas”) de musáceas que puedan asegurar el mantenimiento de los cultivos y la obtención de plantas con características de interés (Roca y Mroginski, 1993; Novak, 1992; Sandoval, 2001; Colmenares y Giménez, 2003; Bustamante, 2004; Díaz, 2004). Además se estudia la factibilidad de proporcionar semilla viable, adaptada a las condiciones agroecológicas propias del municipio Alberto Adriani, estado Mérida y sus adyacencias, permitiendo la continuidad del suministro y el mantenimiento de las unidades de explotación, contribuyendo así al desarrollo sustentable de la región y del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las inflorescencias masculinas de *Musa* spp. (Plátano var. Manzano AAB) obtenidas de plantas vigorosas (Figura a, b) provenientes de diferentes unidades de producción, del municipio Alberto Adriani; fueron previamente limpiadas y sumergidas en una solución estéril de ácido ascórbico 500 mg l⁻¹, durante 15 min. Posteriormente los raquis obtenidos fueron esterilizados en una solución de hipoclorito de sodio al 2% más dos gotas de Tween 20, durante 5 min y suave agitación, luego se lavaron con agua destilada estéril.

Se removieron las brácteas hasta lograr una longitud del raquis de 1,1 cm (Figura c) con ápice (explante) de 0,5 mm de longitud y sumergidos en ácido ascórbico 250 mg l⁻¹ antes de cultivarlos.

**FIGURA.**

Inflorescencia masculinas (bellotas) de *Musa* spp. (Plátano variedad Manzano AAB). a) Bellota con el caquis recortado para conservar a 5 °C. b) Etapas y longitud de la inflorescencia antes de la siembra. c) Explante cultivado en tubo de cultivo con medio MS1. (Etapa I). d) Explante con estructuras de primordios de vástago desarrolladas entre las axilas de las brácteas. (EtapaII) e) Primordios individualizadas f) Proliferación en racimo. (Etapa III). g) Primordio alargado blanco. h) Primordio alargado y con desarrollo del sistema fotosintético (Etapa IV) i) Plántula con sistema radicular (Etapa V).

Etapa I o Establecimiento del cultivo: los explantes se cultivaron en tubos de cultivo sigma® C-5916 con 15 ml de medio Murashige y Skoog (1962; MS1 Cuadro 1) y 0,8% de agar (Figura c).

Etapa II o Inducción de primordios: los explantes establecidos fueron cultivados en el medio MS2, (MS1 con dos concentraciones BAP (TI = 1,5 mg l⁻¹ y TII = 3 mg l⁻¹) manteniendo el control (MS1).

Etapa III o de expresión de primordios: una vez inducidos, los explantes fueron colocados en medio de germinación de Shenk y Hildebrandt (1985; SH) Ç;Ç citado en Roca y Mroginski (1993) en el Cuadro 2 suplementado con 3,2 µM de BAP (MS3). Figuras d,e,f. Las condiciones de incubación para estas etapas fueron 12 h luz, 12 h oscuridad, a 27 °C.

Etapa IV o de desarrollo y alargamiento: en la semana 12 los explantes desarrollados y alargados, se individualizaron; y fueron cultivados en MS1 suplementado con 1 mg l⁻¹ ANA y 2% de gelrite, (MS4) durante (04) semanas (Figuras g, h).

Etapa V o de enraizamiento: los primordios de vástagos desarrollados fueron subcultivados en medio MS ½ (MS5) Figura i, durante 8 semanas, fotoperíodo de 16 h luz y 14 h de oscuridad a 27 °C, logrando el desarrollo del sistema radicular.

Etapa VI o aclimatación: una vez desarrolladas las plantas y con una longitud promedio de 12 cm se cultivaron en sustrato arena y compost en una proporción 1:1. Para el análisis estadístico se realizó comparando las medias obtenidas a través del test de Tukey y utilizando el programa ç Statistic versión 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el establecimiento de la micropropagación *in vitro*, entra en juego una interacción explante – medio de cultivo – concentraciones fitohormonales y condiciones ambientales (fotoperíodo, temperatura, humedad relativa) según Tacoronte (1997), lo que se pudo corroborar en este trabajo. Al analizar las diferentes etapas del cultivo se detectó que en la etapa I, el explante manifestó adaptación y estabilidad fisiológica, vigorosidad y aumentó su diámetro, coincidiendo con Sandoval (1985).

CUADRO 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

Compuestos	mg l ⁻¹
Nitratos:	
NH ₄ NO ₃	10
KNO ₃	
Sulfatos:	
MgSO ₄ .7H ₂ O	
MnSO ₄ .4H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	
CuSO ₄ .5H ₂ O	
Haluros:	
CaCl ₂ .2H ₂ O	
KI	10
CoCl ₂ .6H ₂ O	
Micronutrientes:	
KH ₂ PO ₄	
H ₃ BO ₃	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	
FeSO ₄ .7H ₂ O	
Na ₂ EDTA	10
Myo-inositol	10
Acido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina HCL	1
Glycina	1
Sacarosa 3%	30g l ⁻¹
Agar 0,8 % - 1 %	

El explante responde a la inducción hormonal con la citoquinina y entre 12 y 14 semanas, se observó el desarrollo de los primordios inducidos por la presencia de la estructuras meristemoides, llamadas así por Zamora *et al.* (2002); y definidas como primordios por Cronauer y Krikorian (1985). Estas estructuras blanquecinas, ovaladas y consistentes aparecieron entre las axilas de las brácteas y las estructuras florales; Figura (d,e) características observadas también por, Cronauer y Krikorian (1985).

En el tratamiento TII se produjeron 53 primordios, mientras que TI

CUADRO 2. Composición del Medio de cultivo Schenk e Hildebrandt (SH 1985).

Compuesto	mg l ⁻¹
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
CaCl ₂ ·2H ₂ O	151
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400
KNO ₃	1 000
H ₃ BO ₃	0,1
CUSO ₄ ·5H ₂ O	0,2
Na ₂ EDTA	20,1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
KI	0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1
Myo-inositol	1 000
Acido nicotínico	5
Piridoxina	0,5
Tiamina Hcl	5

presentó 24 primordios. En las semanas 14 y 15 para ambos tratamientos se presenta la máxima expresión de primordios, para TII (3 mg l⁻¹ BAP) con 62 primordios y TI (1,5 mg l⁻¹ BAP) obtuvo 58; a diferencia de Cronauer y Krikorian (1985) que observaron esta máxima expresión en la semana 18 con 5 mg l⁻¹ de BAP. Lo que indica que una alta concentración de la fitohormona pudiera estar retardando la respuesta.

De acuerdo al análisis estadístico (Cuadro 3) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos TI y TII, durante las semanas de producción de primordios. Lo que indica que las dos concentraciones de BAP utilizadas tienen la misma incidencia en la respuesta. Pero existen diferencias significativas (Cuadro 1) entre el tratamiento control y los tratamientos TI y TII. Lo que demuestra que se requiere la presencia de BAP para alcanzar la inducción de primordios.

En el ANOVA, para las semanas de muestreo se realizan pruebas

CUADRO 3. Medias de Primordios de *Musa* spp. (Plátano Variedad Manzano AAB) por tratamiento /semana.

	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15	Semana 16	Semana 17
Control	0,00±0,00 a	0,04±0,20 a	0,62±1,52 a	0,83±1,76 a	0,83±1,99 a	0,50±1,10 a
T-I	1,00±2,41 ba	1,87±230 b	1,83±2,46 a	2,41±2,76 ba	2,12±2,04 a	1,54±2,39 a
T-II	2,20±2,70 b	2,04±2,97 b	2,58±4,16 a	1,29±1,78 b	2,29±3,04 a	2,00±2,85 a

Los valores indican Promedio (X) ± Desviación estándar (DE). Las letras diferentes acompañando a los valores, indican que hay diferencia significativa entre medias, según el Test de Tukey (P<0,05). Fuente: Propia, (2005).

a posteriori de comparación de medias de Tukey y los tratamientos aplicados en la investigación al menos uno es diferentes para esas semanas de muestreo. Las tasas de proliferación de estos tejidos cultivados no son uniformes y dependen de factores como el tamaño del explante, la composición del medio y el estado fisiológico del tejido. Según Cronauer y Krikorian, (1983a), citado por Roca y Mroginski (1993) la inducción, el control del crecimiento y la morfogénesis están determinados por las relaciones hormonales suministradas en el medio de cultivo (sustrato). De esta manera pudo determinarse la obtención de plántulas mediante la técnica *in vitro* a partir de meristemas florales masculinos, promovidas por la presencia de Citoquinina BAP, en 28 semanas.

Los primordios, provenientes del tratamiento TII, una vez individualizados y cultivados en el medio MS4 con 1,5 mg l⁻¹ de ANA, se alargaron y desarrollaron el aparato fotosintético, presentando características de un vástago, mientras que los primordios originados del TI, su alargamiento fue en menor proporción, lento y de color blanquecino (Figura h) dando una apariencia albina, igual que en el ensayo de Zamora (2002). Al disminuir la concentración ANA en el medio de cultivo, en los vástagos provenientes de TI y TII se indujo la formación de raíces. Las plantas fueron aclimatadas y actualmente se encuentran en evaluación en el campo.

BIBLIOGRAFÍA

BUSTAMANTE, R. 2004. Contribución a la Micropropagación clonal de *Musa* spp. (Plátano var. Hartón AAB) a través de ápices vegetativos. Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

CRONAUER, M. and D. KRIKORIAN 1985. Determinate floral buds of plantain (*Musa* AAB) as site of adventitious shoot formation Ann of bot. 61:507-512. New York.

COLMENARES, M. y C. JIMÉNEZ 2003 . Nuevas estrategias para la inducción de brotes en *Musáceas*. http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-065.pdf

DÍAZ, L. 2004. Optimización de la propagación de *Musa* (*Musa* sp. Var. Hartón AAB). Estudio de técnicas para la determinación somaclonal de plantas regeneradas. Mérida, Venezuela.

GIMÉNEZ, C. de GARCÍA E, N. XENA and I. BLANCO. 2001. Somaclonal variation in banana: Cytogenetic and molecular characterization of somaclonal variant *in Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 37:217-222.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:474-497.

NOVAK, F. J. 1992. *Musa* (Bananas and plantain) **In:** Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Hammerschlag, F. A. and Litz, R.E.(Eds) C.A.B. International. Wallingford, Oxford, U. K. pp 488-499.

ORGANIZACIÓN PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 1999. <http://www.fao.org>.

ROCA, W. y L. MROGINSKI. 1993. Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Editores técnicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT) Cali, Colombia.

SANDOVAL, J. A. 2001. Manual Básico. Biotecnología aplicada para la Micropropagación de banana y plátano. (*Musa* AAA, AAB). Costa Rica. pp. 3-25.

TACORONTE, M. 1997. Cultivos *in vitro* una alternativa de propagación vegetativa en *Swietenia macrophylla king* (Caoba). Mérida, Venezuela.

ZAMORA, PAET, DAMASCO y De la CRUZ. 2002. *In vitro* conservation and cryopreservation in the Philippines. University of the Philippines at Los Baños, Los Baños, Laguna, Philippines. (IDIAP). <http://www.mida.gob.pa/idiap/biotec.html>.