

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FITOHORMONAS EN LA MICROPROPAGACIÓN DEL PLÁTANO DOMINICO HARTÓN (*Musa AAB Simmonds*)

EVALUATION OF THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF PHYTOHORMONES IN MICROPROPAGATION OF DOMINICO HARTÓN PLANTAIN (*Musa AAB Simmonds*)

JOSÉ LUIS HOYOS¹, CRÍSPULO PEREA ROMÁN², REINALDO J VELASCO M³

PALABRAS CLAVES:

Micropropagación, plátano, hormonas, multiplicación, brotes

KEY WORDS:

Micropropagation, plantain, hormones, multiplication, buds.

RESUMEN

*Se evaluó el efecto de la concentración hormonal en la generación de brotes al micropropagar plátano dominico hartón (*Musa AAB Simmonds*) con 10 tratamientos en un diseño completamente al azar (DCA). Se probaron tres concentraciones de BAP y AIA en arreglo factorial 3x3: 0.01; 0.5 y 5 mg/L. Los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p < 0.01\%$) en la etapa de multiplicación in vitro. Los resultados de la prueba de DMSt mostraron que el mayor número de brotes se produjo con las combinaciones 5mg/L de BAP / 0.5mg/L de AIA y 5mg/L de BAP / 0.01mg/L de AIA. Para determinar la óptima concentración de AIA a partir del rango resultante (0.01-0.5mg/L), se realizó un experimento adicional con 6 tratamientos en DCA, variando solamente la concentración de AIA. Las concentraciones 0.2 y 0.3 mg/L de AIA ($p < 0.01\%$) generaron el mayor número de brotes en la etapa de multiplicación.*

ABSTRACT

*The effect of the hormonal concentration in the generation of bud in micropropagation of dominico-harton plantain (*Musa AAB Simmonds*) was evaluated with 10 treatments in a Complete Randomized Design (CRD). Three concentrations of BAP and IAA in a 3x3 factorial arrangement: 0,01; 0,5 and 5 mg/L were tested. The treatments presented significant differences ($p < 0.01\%$) in vitro multiplication phase. The MSDt test showed that the major number of bud were found with 5mg/L of BAP / 0.5mg/L*

Recibido para evaluación: julio 23 de 2008. Aprobado para publicación: noviembre 15 de 2008

1. Ingeniero Agroindustrial. Especialista en Biotecnología. Docente Facultad Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca, Popayán.
2. Estudiante de Ingeniería Agropecuaria. Universidad del Cauca, Popayán. e_mail: perea8877@hotmail.com
3. Ingeniero Químico, M.Sc, Especialista en Biotecnología. Docente Facultad Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca, Popayán.

Correspondencia: José Luis Hoyos Concha. e-mail: jlhoyos@unicauca.edu.co

of AIA and 5mg/L of BAP / 0.01mg/L of AIA combinations. To determine the optimum concentration of AIA from the resultant rank (0,01-0,5 mg/L), an additional experiment with 6 treatments in a Complete Randomized Design (CRD), varying only AIA concentration was conducted. The concentrations 0.2 and 0,3 mg/L of AIA ($p < 0.01\%$) generated the biggest number of sprouts in the stage of multiplication.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de plátano se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, el estimado de la producción es de 88 millones de toneladas al año con un área calculada de siembra de 10 millones de hectáreas. Forma parte de la dieta alimenticia de más de 400 millones de personas y se ubica en el cuarto renglón en la categoría de productos alimenticios de gran demanda después del arroz, el trigo y la leche [1]. El plátano es un fruto altamente energético, sus carbohidratos son fácilmente asimilables por el organismo. El fruto esta compuesto principalmente de agua, carbohidratos, proteínas y grasas, además es rico en vitamina A, B, C, E y minerales, debido a esto se ha convertido en un producto de alta demanda en la alimentación mundial [2]. Posee diferentes usos entre los que se destacan el medicinal, la producción de alcohol y como fuente de fibra [3] y [4].

En Colombia, el plátano se produce principalmente en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Huila, Nariño, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima, Valle del Cauca y Arauca. Este cultivo equivale al 23% de los cultivos permanentes, anualmente se destinan algo más de 590.000 ha para su cultivo.

La biotecnología ofrece nuevas oportunidades para la seguridad alimentaria, donde el plátano es fuente importante de alimento, fundamentalmente en países en vía de desarrollo [5].

Las plantas presentan características particulares al permitir la obtención de estructuras organizadas de novo a partir de células, tejidos y organos, cuando estos se cultivan en condiciones apropiadas (morfogénesis). Si la formación de plantas, involucra la formación inicial de brotes o yemas adventicias y el posterior enraizamiento de éstos, se da una morfogénesis organogénica [6]. A través de las técnicas existentes es posible multiplicar asexualmente cualquier especie vegetal de tal manera que se mantenga el mismo genotipo en el material derivado de la planta original. Este método de propagación vegetativa se denomina micropropagación o propagación clonal.

La micropropagación de cultivos perennes y transitorios ha contribuido al desarrollo de la producción agronómica de las últimas décadas. Gracias a esta técnica se pueden generar clones de variedades élites en grandes cantidades, con un conjunto de beneficios adicionales respecto a la propagación tradicional [7]. Esta técnica permite un control fitosanitario estricto, obtención de gran número de clones en espacios reducidos y con características homogéneas, plantas libres de virus, siendo una herramienta de utilidad para el fitomejorador [7].

La micropropagación se divide en cinco fases que corresponden a la preparación del material vegetal, establecimiento aséptico del cultivo, multiplicación, enraizamiento y finalmente la adaptación a campo. En las fases de multiplicación y enraizamiento las citoquininas y las auxinas juegan un papel importante [7].

Las citoquininas fueron descubiertas en la década de 1950 como factores que promueven la proliferación celular y mantienen el crecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Poco después de su descubrimiento Skoog y Miller propusieron que la formación de órganos en las plantas se debe al balance existente entre las citoquininas y las auxinas. Usando cultivos de tabaco, demostraron que un balance alto de auxinas favorecía la formación de raíces, mientras que un balance alto de citoquininas favorecía la formación de tallos [8]. Aparte de su papel como reguladores de la formación de nuevos órganos, las citoquininas también intervienen en la apertura de estomas, supresión de la dominancia apical e inhibición de la senescencia de las hojas entre otros procesos. *In vitro* la citoquinina mas utilizada es la 6- Bencilaminopurina (BAP) [9].

El nombre auxina significa en griego "crecer" y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (IAA) es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. Las Auxinas pertenecen al grupo de hormonas vegetales; son sustancias naturales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Afectan el crecimiento del tallo,

las hojas y las raíces y el desarrollo de ramas laterales y frutos. Las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales, estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución [9].

Es conocido que los costos de la micropropagación son generalmente altos y pueden llegar a ser un impedimento para la aplicación de esta técnica como opción en sistemas productivos. Es importante plantear alternativas que faciliten este proceso, estudiando protocolos con variaciones en sus componentes, con el fin de buscar un tratamiento que permita la obtención de resultados que faciliten la implementación de técnicas de propagación *in vitro*. De esta forma, el estudio evalúa la fase de multiplicación, en la cual la obtención de mayor número de brotes viables es un criterio para evaluar la sostenibilidad de esta tecnología.

METODOLOGÍA

El material vegetal (*Musa* AAB Simmonds), se obtuvo de la colección que posee la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), y fue establecido en la finca la Sultana de la Universidad del Cauca ubicada en el municipio de Timbio (Cauca). Se le realizó un seguimiento en campo hasta la emisión de racimo, teniendo como base para la selección del material a trabajar características morfológicas y fitosanitarias adecuadas.

La fase de establecimiento y multiplicación se adelantó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca. Teniendo en cuenta las características *in vitro*, inicialmente se cultivaron las plantas en condiciones de alta humedad relativa (80%) y baja intensidad luminosa.

Los ápices caulinares para el establecimiento en laboratorio, se incubaron a temperatura de 26 a 32 °C, con una intensidad luminosa entre 2000 y 5000 lux.

Para el establecimiento de los tejidos vegetales en laboratorio, se seleccionaron y desinfectaron los cormos con NaOCl 5% y Tween-20 (0.001% v/v), realizando un corte de 2.5 - 3 cm de diámetro y de 4 - 5 cm de longitud. Posteriormente, se realizó un segundo corte

disminuyendo el tamaño del explante de 1 - 1.5 cm de diámetro y de 2 - 3 cm de longitud, realizando una desinfección con NaOCl 2% y Tween-20 (0.001% v/v) durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con abundante H₂O D.E. El material se estableció en un medio MS plus, al cual se le adicionó 1mg/L BAP/0.2mg/L AIA.

Para la etapa de multiplicación se estableció un experimento en el que se evaluaron 10 tratamientos en un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3x3 aumentado en uno (testigo) con cuatro repeticiones, variando las concentraciones de hormonas (AIA y BAP), con el fin de determinar en cual de ellos se observaba un mejor efecto en la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano (*Musa* AAB Simmonds). Se estableció un testigo (T0) sin adición de hormonas. Para los tratamientos restantes se realizó variación en la concentración de BAP y AIA, combinando tres rangos, de acuerdo a ensayos preliminares: 0.01, 0.5 y 5 mg/L [10], [11], [12]. Las combinaciones se ilustran en el cuadro 1.

Para cada tratamiento, se prepararon 100ml de medio, estableciendo 4 repeticiones, cada una con un contenido de 25 ml. El medio presenta componentes fijos de la siguiente forma: sales de MS plus 4.3 gr/L, myo- inositol 100mg/L, azúcar 40gr/L, agar Difco 7gr/L, tiamina 1mg/L, glicina 1mg/L, L-cisteina 1mg/L, piridoxina 0.5mg/L, ácido nicotínico 0.5mg/L, H₂O D.E, pH a 5.8 ± 0.1.

Para la etapa de multiplicación, se tomaron plantas *in vitro* bien formadas, de tamaño uniforme procedentes

Cuadro 1. Tratamientos

Tratamiento	Concentración de BAP en mg/L	Concentración de AIA en mg/L
T1	0.01	0.01
T2	0.01	0.5
T3	0.01	5
T4	0.5	0.01
T5	0.5	0.5
T6	0.5	5
T7	5	0.01
T8	5	0.5
T9	5	5
T0 (testigo)	0	0

de la fase de establecimiento. A estas, se les efectuó un corte hasta dejar un explante de 0.3 - 0.5 cm de diámetro y de 0.5 - 1 cm de longitud, seguido de una desinfección con NaOCl 1% y Tween-20 (0.001% v/v) durante 1 minuto. Se procedió a la siembra de los explantes y se registraron observaciones diarias.

RESULTADOS

En los 10 tratamientos se determinó la producción de brotes durante un periodo de 21 días. Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la figura 1.

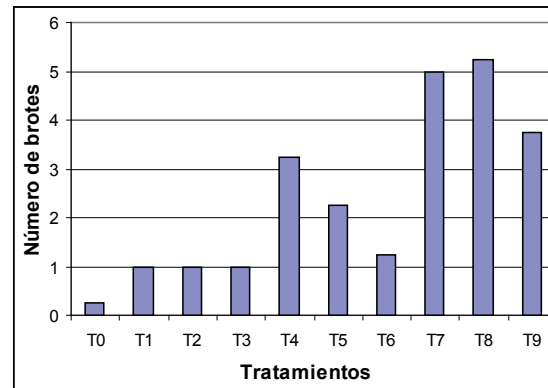
Mediante un análisis de varianza (ANOVA), los tratamientos asignados presentaron diferencias significativas ($p < 0.01\%$) en la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano dominico hartón (*Musa AAB Simmonds*). (Cuadro 2)

Mediante una prueba de promedios DMSt ($\alpha = 0.01\%$), se observó que los tratamientos que presentaron mejor efecto sobre la multiplicación *in vitro* de plátano fueron T7 y T8 asignados con la letra (a) según cuadro 2, los cuales no presentaron diferencias significativas en cuanto a la respuesta obtenida.

En orden de respuesta continuaron T9 (b), T4 (c) y T5 (d). Este comportamiento se debe al alto contenido de citoquinina. La hormona BAP tiene un efecto directo sobre la generación de brotes. Se sintetizan principalmente en raíces y se transportan desde las raíces al tallo a través de los haces vasculares. Esta hormona estimula el desarrollo de los brotes laterales, la multiplicación celular en los meristemos apicales y expansión de las hojas. Al no presentar el explante raíces, este no tiene la capacidad de sintetizar BAP, por lo cual, es fundamental su adición en la etapa de multiplicación.

En los tratamientos con mayor proporción auxina/citoquinina que corresponden a T2 (f), T3 (f), y T6 (e), se observó efecto de dominancia apical, enraizamiento y crecimiento, incluyendo desarrollo foliar. Las auxinas tienen la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; además promueven la multiplicación y crecimiento celular y la expansión de las hojas, producen dominancia apical, formación de raíces ad-

Figura 1. Generación de brotes



Cuadro 2. Prueba en multiplicación

Tratamiento	Brotos Promedio	DMS
T0	0.25	g
T1	1.00	f
T2	1.00	f
T3	1.00	f
T4	3.25	c
T5	2.25	d
T6	1.25	e
T7	5.00	a
T8	5.25	a
T9	3.75	b

venticias y raíces laterales. Sin embargo, se presentan diferencias significativas de T6 con respecto a T2 y T3, obteniendo mejor respuesta T6, debido al mayor contenido de BAP frente a T2 y T3.

Los tratamientos T1 (f), T5 (d) y T9 (b), presentan igual proporción de auxina/citoquinina. El tratamiento T1 (0.01mg/l BAP/0.01mg/l AIA), presentó un brote, T5 (0.5mg/l BAP/0.5mg/l AIA) con 2.25 brotes y T9 (5mg/l BAP/5mg/l AIA) con 3.75 brotes (ver cuadro 1). En los tratamientos T9 y T5, cuando la adición de citoquinina fue igual o mayor de 0.5 mg/L, a pesar de presentar igual concentración de auxina que de citoquinina (ver cuadro 1), la concentración de BAP indujo la generación de brotes, por la mayor disponibilidad de esta en el medio. No obstante, altos contenidos de auxinas en el medio disminuyen la acción de la citoquinina, por lo cual, los tratamientos en mención no obtuvieron respuesta similar a T7 y T8 [13].

El tratamiento T0 (g), que corresponde al testigo, presentó la menor respuesta a la generación de brotes en la etapa de multiplicación con respecto a los tratamientos restantes, debido a la ausencia exógena de hormonas.

Los tratamientos T7 y T8 con concentraciones de BAP de 5 mg/L, presentaron la mejor respuesta, no obstante la concentración de auxina fue de 0.01mg/L para T7 y 0.5 mg/L para T8. Para determinar, la concentración de auxina que en este rango logre obtener el mayor número de brotes, se realiza un segundo experimento.

El cuadro 3, resume los tratamientos para determinar la concentración de AIA dejando como factor fijo la concentración de BAP (5mg/L) encontrada en el experimento anterior.

Los resultados obtenidos mediante un análisis de varianza (ANOVA) al 99% de confiabilidad ($\alpha=0.01\%$), muestran que los tratamientos asignados presentan diferencias significativas (figura 2). La prueba de promedio por el método de DMSt al 99% de confiabilidad ($\alpha=0.010\%$), arroja que los tratamientos T3 (5mg/L BAP/ 0.2 mg/L AIA) y T4 (5mg/L BAP/ 0.3 mg/L AIA) catalogados con la letra (a) son los que presentaron mejor respuesta a la emisión de brotes, como se observa en el cuadro 4. Esto permite ratificar la importancia de una combinación adecuada BAP/AIA para la obtención de un número óptimo de brotes. (Figura 2.)

Comparado los resultados obtenidos con estudios realizados por Canchignia, 2004, en la etapa de multiplicación cuando se utilizaron concentraciones de 2.5 mg/L BAP/ 0.8 mg/L AIA en la variedad barragante, se obtuvieron 5.25 brotes. Con respecto a evaluaciones presentadas por Perez, (Cuadro 4)

2006, reportan concentraciones de 4mg/L de BAP y 0.65mg/L de AIA, durante la fase de multiplicación para el híbrido AAAB [11]. Roca, 1993, establece que los mejores resultados en la etapa de multiplicación se obtienen cuando se utilizan concentraciones de 5mg/L de BAP y 0.5 mg/L de AIA [12].

Las concentraciones comúnmente empleadas en la multiplicación de brotes oscilan entre 2-5 mg/L. Se han utilizado concentraciones de hasta 10 mg/L de BAP, los cuales en el clon Zanzibar (AAB) forman yemas múltiples [14]. Otros han empleado esta concentración en la

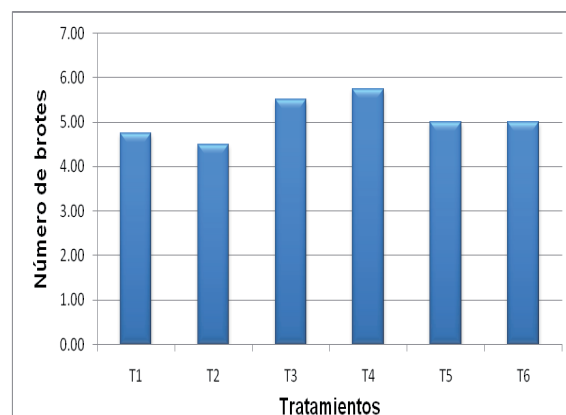
Cuadro 3. Determinación de AIA

Tratamientos	Concentración de BAP mg/L	Concentración de AIA mg/L
T1	5	0.01
T2	5	0.1
T3	5	0.2
T4	5	0.3
T5	5	0.4
T6	5	0.5

Cuadro 4. Prueba de promedios

TRATAMIENTO	PROMEDIO
T1	4.75(c)
T2	4.80 (c)
T3	5.50 (a)
T4	5.75 (a)
T5	5.00 (b)
T6	5.00 (b)

Figura 2. Generación de brotes



formación de multiyemas [15], [16]. Concentraciones entre 3 a 7mg/L de BAP son consideradas como óptimas para la inducción de brotes, sin la formación de raíces [17], [18], [19]. Manejando medios semisólidos se facilita la formación de yemas múltiples [20].

CONCLUSIONES

En el rango para BAP estudiado las concentraciones de 5 mg/L presentaron el mayor número de brotes

Concentraciones de AIA por encima de 0.5mg/L, en los tratamientos independientemente de las concentraciones de BAP, causaron una disminución en la generación de brotes. Igual comportamiento ocurrió cuando la relación auxina/citoquinina fue de uno.

Combinaciones de BAP con 5mg/L y de AIA entre 0.2-0.3mg/L, bajo las condiciones de laboratorio, inducen a la formación de un promedio de 5.0 a 5.75 brotes viables, valor cercano pero superior a estudios reportados por otros autores.

REFERENCIAS

- [1] FAO. 2001. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2001. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Disponible en línea: <http://www.fao.org/SOF/soti/index.htm>
- [2] López, M. 1989. El plátano. Edit. Pueblo y Educación. Pp. 5-6.
- [3] INIBAP. 2001. Muchos usos del banano. Disponible en línea: <http://www.inibap.org>
- [4] INIBAP. 2002. The Dobal *Musa* Genomes Consortium. A strategy for the global *Musa* Genomes Consortium. Report of a meeting held in Arlington, USA, 17-20 July 2001. International Network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. Disponible <http://www.inibap.org>
- [5] INIBAP. 2004. Los bananos vuelven a casa en Asia. INIBAP Annual Report. International Network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. 66 p.
- [6] RAMÍREZ, Hernando. Talleres 3 y 4 de Biotecnología I. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Palmira Valle, Colombia 2000
- [7] CANO, Carlos Gustavo. Biotecnología y propiedad intelectual en el agro. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. 2004
- [8] Mok, D.W.S. y Mok, M.C. (2001): "Cytokinin Metabolism and Action", en *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 52. ISSN, pp. 89-118
- [9] Azcon-Bieto J.; Talon M. (1993), *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, Madrid: McGraw Hill. 84-486
- [10] CANCHIGNIA F., L RAMOS. Micropropagación de plátano variedad Barragante. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador 2004. <http://www.visagesoft.com>
- [11] PÉREZ ESPINOSA. Odalmys. Efecto de la contaminación Bacteriana en la Micropropagación de FHIA 18 (*Musa* spp híbrido AAAB) en la Biofábrica de Cienfuegos. Universidad Agraria de la Habana. Cuba 2006
- [12] ROCA, William; MROGINSKI, Luis. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 1993
- [13] MATTHYSSE, A.G; SCOTT, T.K. Functions of hormones at the whole plant level of organization. *In* Hormonal regulation of Development II. The Functions of Hormones from the level of the cell to the whole plant. Ed. By T.C Scout. Berlin, Springer-Verlag. P. 219 – 244. 1984
- [14] Martínez, S.; C. González.; M. Fonte.; O. Pérez 1992. Evaluación de diferentes métodos de introducción de donantes en Biofábricas. Ponencia al 7mo Forum de Ciencia y Técnica. MINAGRI. 20 p.
- [15] Dore Swany, R, N. K. Sirinasa., E; Chacko. 1983 Tissue culture propagation of banana. *Scientia Horticulturae*, 18: 247-253
- [16] Damasco, O.; L. F. Pateña and C. E. Umali. 1984. "Tissue culture of banana". En: 15 th Scientific meeting of the Philippines. 21 p.
- [17] Zamora, A.; C, Damasco.; E. Estaño.; R. Barba and L. Pataña. 1989. Note: Growth and yield of Micropropagate and sucker derived banana plants (*Musa* spp. Cu. Lakatan, Bongulan and Saba). *De Philippine Agriculturist* 72 (4): 458-465.
- [18] Krikorian, A. D. and S. S. Cronauer. 1984. Banana. In: W. R. Sharp. D. A. Evans, P Ammirato and y. Yamada (Eds): *Handbook of plant cell culture*. New York. Edith Mac Millan Publ. Vol. 2 Pp. 327-348.
- [19] Cronauer S. S. and A. D. Krikorian, 1983. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (*Musa* ABB) *Plant Cell Rep.* 2. Pp. 289-291.
- [20] Martínez, S. 1995. Evaluación de poblaciones obtenidas por cultivo *in vitro* e inducción de mutaciones en plátanos (*Musa* sp). *Centro Agrícola* 19 (2-3): 93-96.