

**Comunicación breve****Optimización del protocolo de propagación del plátano cv. CEMSA ¾ en Biorreactores de Inmersión Temporal**

Cejas Inaudis<sup>1</sup>, Capote Iris<sup>1</sup>, Aragón Carlos E.<sup>1</sup>, Escalona Maritza<sup>1</sup>, Pina Danilo<sup>1</sup>, González Justo<sup>1</sup>, Rodríguez Roberto<sup>2</sup>, Noceda Carlos<sup>2</sup>, Cañal María Jesús<sup>2</sup>, Sandoval Jorge<sup>3</sup>, Roels Sophie<sup>4</sup>, Debergh Pierre<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, 69450, Cuba. Correo electrónico: pfa\_inaudis@agronomia.unica.cu

<sup>2</sup>Departamento Biología y Organismos de Sistemas, Universidad de Oviedo, España.

<sup>3</sup>CORBANA, Costa Rica.

<sup>4</sup>Departamento Producción de plantas, Universidad de Gent, Bélgica.

Recibido: 24/4/10 Aceptado: 28/10/10

**Resumen**

La automatización de la producción de plantas con el empleo de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) constituye una herramienta eficaz para la propagación *in vitro* con la cual se elevan los coeficientes de multiplicación y se aumenta la calidad del material propagado. Algunos factores que influyen en este proceso son las características de los explantes que se emplean para inocular los BIT, la manipulación de los mismos y su estado fisiológico. Estos, aparejados a los indicadores de eficiencia del sistema, son elementos a tener en cuenta en el estudio de la morfogénesis de cultivos como el plátano, que presenta índices de proliferación bajos en medio semisólido. Con el objetivo de optimizar el protocolo descrito por Roels, *et al.* (2005), se evaluó el efecto del manejo del explante (con división y sin división), el volumen de medio de cultivo durante tres ciclos de proliferación de brotes de plátano cv. CEMSA ¾ sobre el coeficiente de multiplicación y la calidad de los mismos. El mayor coeficiente de multiplicación se logró con el tratamiento en el que se incrementó el volumen del medio de cultivo en función de la biomasa sin seccionar el explante durante los tres ciclos de propagación. Estas modificaciones al protocolo de Roels, *et al.* (2005), al reducir la manipulación de los explantes durante cada ciclo de cultivo y aumentar las tasas de multiplicación, lo hacen más eficiente y simple, y de esta manera más aplicable para la propagación de plátano a gran escala.

Palabras clave: metatopolina, morfogénesis, Musa, propagación masiva

**Summary****Optimizing protocol of plantain propagation cv. CEMSA ¾ in Temporary Immersion Bioreactors**

The automation of the production of plants with the use of Temporary Immersion Bioreactors (TIB) is an effective tool for *in vitro* propagation, with which rates of multiplication and increases the quality of the material spread are increased. Some factors influencing this process are the characteristics of the explants used to inoculate the BIT, the manipulation of the data and the physiological state. These factors, coupled with efficiency indicators of the system, are elements to be considered in the study of morphogenesis in crops such as plantain, which has low growth rate in semisolid medium. In order to optimize the protocol described by Roels, *et al.* (2005), we evaluated the effect of management of the explants (with division and without division), the

volume of culture medium for three cycles of shoot proliferation of banana cv.  $\frac{3}{4}$  CEMSA on the coefficient of multiplication and their quality. The highest multiplication rate was achieved with the treatment which increased the volume of culture medium in terms of biomass without severing the explants during the three cycles of propagation. Since they reduce the manipulation of the explants for each crop cycle, and they increase the multiplication rate making it more efficient and simple, these modifications to the protocol of Roels, *et al.* (2005), make more applicable the propagation of plantain on a large scale.

**Key words:** metatopolina, morphogenesis, Musa, mass propagation

## Introducción

Los bananos y plátanos son de gran importancia en numerosos países en vías de desarrollo. Más de 400 millones de personas que habitan en zonas tropicales y subtropicales dependen del cultivo de las musáceas, con el cual obtienen ingresos económicos relevantes tanto en mercados locales como en los de exportación.

El plátano es un componente básico en la dieta de la población cubana. Origina ingresos y empleo a muchas familias, contribuye al ahorro de divisas en el país, y constituye un soporte de la economía nacional. La producción total de plátano en Cuba durante el año 2008 fue de 804.967 toneladas (MINAGRI, 2008).

La propagación *in vitro* de plantas de *Musa* a escala comercial se ha consolidado mundialmente y la regeneración vía organogénesis a partir de ápices se mantiene como el método más utilizado. Esto se debe, principalmente, a la posibilidad de multiplicar plantas libres de patógenos con una adecuada estabilidad genética. Las técnicas comerciales de micropropagación de bananos y plátanos forman parte de la modernización de la agricultura y contribuyen a mejorar las condiciones sanitarias y productivas de las plantaciones.

La producción rápida de plantas del género *Musa* se facilita con técnicas *in vitro*, sin embargo, el potencial máximo de multiplicación del plátano no se logra debido a problemas relacionados con la variación somaclonal, la hiperhidricidad, la necrosis y la abscisión de meristemos apicales y hojas, entre otras causas. La capacidad morfogenética de las plantas y las tasas de proliferación de estos tejidos cultivados no son uniformes y dependen de factores como el tamaño del brote que se emplea como explante,

el número de brotes subcultivados, el tipo de corte que se realice (transversal o longitudinal), la consistencia del medio de cultivo (líquido o semisólido) y el estado fisiológico del tejido (Martin, *et al.*, 2007).

Con el objetivo de mejorar la micropropagación convencional, aparejado con el incremento de conocimientos acerca de la morfología y fisiología del cultivo y vinculado a las numerosas limitaciones que posee el método de cultivo *in vitro*, existe la necesidad de buscar nuevos protocolos que respondan mejor y aumenten la tasa de multiplicación de los brotes y la calidad de los mismos.

En este sentido, aprovechando las ventajas que ofrece la semi-automatización del proceso de micropropagación, Roels, *et al.* (2005) ensayaron diferentes variables para incrementar la tasa de multiplicación y la calidad morfológica de los brotes del plátano «CEMSA  $\frac{3}{4}$ » en los (BIT). Variables como las relacionadas con el tipo de explante (tipos de brotes, y manejo del explante), composición del medio de cultivo (tipo y concentración de citoquininas), operación del sistema de inmersión temporal (tiempo y frecuencia de inmersión, volumen de medio de cultivo/explante, proporción volumen gaseoso del frasco/explante); y el ciclo de multiplicación (número de ciclos de micropropagación y duración del subcultivo). En este protocolo se emplea la 6-(3- hidroxibenzilaminopurina) mT (metatopolina), la cual se emplea por primera vez en *Musa* y resultó más efectiva para la proliferación en los BIT (Escalona, *et al.*, 2003).

Con el empleo del subcultivo sucesivo en BIT (tres ciclos de 28 días cada uno) y la inoculación de explantes previamente seccionados del Tipo I (brotes con un diámetro de la base mayor de 3 mm), es posible incrementar en cada ciclo la tasa de multiplicación en 9.4 brotes/explante, así como la cali-

dad de los mismos (Roels, *et al.*, 2005). Sin embargo, este procedimiento resulta poco eficiente para la propagación a gran escala pues involucra una mayor manipulación del tejido y altas pérdidas por contaminación.

Con el objetivo de optimizar el protocolo antes descrito, en el presente trabajo se evaluó el efecto del manejo del tipo de explante (con o sin división) y el volumen de medio de cultivo durante los tres ciclos de propagación de los brotes de plátano «CEMSA  $\frac{3}{4}$ » sobre el coeficiente de multiplicación y la calidad de los brotes recuperados.

### Materiales y métodos

El Biorreactor de Inmersión Temporal que se empleó fue el descrito por Escalona, *et al.* (1999) constituido por vasos de cristal de 1000 ml de capacidad. El tiempo y la frecuencia de inmersión fueron de cuatro minutos cada tres horas. El medio de cultivo contiene las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) con suplemento de 3% de sacarosa y 4,44  $\mu\text{mol/l}$  de 6-(3- hidroxibenzilaminopurina) mT (metatopolina) (Escalona, *et al.*, 2003). La multiplicación se desarrolló durante tres ciclos de 28 días cada uno según lo establecido en el protocolo de propagación de este cultivo (Roels, *et al.*, 2005).

Los explantes seleccionados para inocular en los BIT fueron cinco brotes (10 inóculos) de plátano del cultivar «CEMSA  $\frac{3}{4}$ », todos de Tipo I (brotes con diámetro en la base del tallo mayor a 3 mm), los cuales se dividieron longitudinalmente con el fin de eliminar la dominancia apical. Los brotes provenían de un tercer subcultivo en medio semisólido. El medio basal consistió de sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) con suplemento de 3% de sacarosa y 13,3  $\mu\text{mol/l}$  de 6-benciladenina (BA).

El pH se ajustó a 5,8 antes de la esterilización por autoclave a 121 °C y 1,2 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 30 minutos. Los cultivos se colocaron en estantes bajo un régimen de temperatura de 25 ± 1,0 °C y luz blanca fluorescente que garantizó un Flujo de Fotones Fotosintéticos (FFF) de 30-40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Para evaluar el efecto del manejo de los explantes se ensayaron dos tipos de manejo 1) brotes de Tipo I seccionados longitudinalmente después de cada ciclo (control según protocolo) y 2) brotes que

permanecieron sin seccionar durante los tres ciclos de propagación. Se evaluaron dos volúmenes de medio de cultivo: 1) 150 ml (30 ml/explante según protocolo) y 2) volumen de medio de cultivo dependiente del incremento en la biomasa. Para calcular este incremento se tuvo en cuenta el promedio de la masa fresca inicial de cinco brotes seccionados, sin hojas y el volumen de medio de cultivo adicionado, esta proporción se mantuvo en todos los tratamientos por igual. Siempre después de cada ciclo de 28 días se realizó una renovación del medio de cultivo manteniendo la composición referida anteriormente.

Se desarrolló un experimento bifactorial con cuatro tratamientos los cuales se describen a continuación.

- I. Explantes Tipo I seccionados, con un volumen de medio de 150 ml (S/150 ml).
- II. Explantes Tipo I seccionados con incremento del volumen de medio en función de la biomasa (S/mlxBiomasa).
- III. Explantes de Tipo I sin seccionar con volumen de 150 ml (NS/150 ml).
- IV. Explantes Tipo I sin seccionar con incremento del volumen de medio en función de la biomasa (NS/mlxBiomasa).

Los brotes tipo I (brotes con diámetro > 3 mm), brotes de tipo II (brotes con diámetro < 3 mm) y brotes de tipo III (yemas sin hojas) (Roels, *et al.*, 2005), se contaron y se calculó la tasa de multiplicación (número total de brotes de Tipo I, II y III / número de brotes inoculados) en los tratamientos I y II a los 28 días de la proliferación y se determinaron otros indicadores morfológicos de calidad como el Tamaño del brote (cm), diámetro del brote (cm), número de hojas/brote, número de raíces/brote y masa fresca (g). Los tratamientos III y IV solo se evaluaron al final del experimento.

Cada tratamiento se replicó tres veces. El coeficiente de multiplicación representa el promedio de tres BIT por tratamiento, mientras que para los indicadores de calidad se tuvo en cuenta cada brote como unidad experimental. Se realizó un análisis de homogeneidad de varianza (Levenne) y un test de normalidad por Kolmogorov Smirnov. Para la significación se realizaron comparaciones entre las medias obtenidas de cada indicador con el empleo del

utilitario estadístico Statgraphics Plus 5.1 Pro Esp. teniendo en cuenta la significación para valores de  $p \leq 0.05$ , según la prueba de Tukey.

## Resultados y discusión

Los resultados de la interacción entre el seccionado de los brotes del Tipo I y el volumen de medio de cultivo sobre las tasas de multiplicación, la presencia de diferentes tipos de brotes y la distribución de los mismos en cada tratamiento, se muestran en la Figura 1.

El mayor coeficiente de multiplicación (16,8) se logró en el tratamiento donde se incrementó el volumen de medio de cultivo en función de la biomasa y no se seccionó el explante durante los tres ciclos de proliferación. También bajo esta estrategia se logró el mayor número de brotes por BIT (50,8) y una ma-

yor proporción de brotes de Tipo I. Nótese que sólo el 20% de los brotes en este tratamiento son del tipo II y III. Los brotes Tipo I una vez concluyen los tres ciclos de cultivo se encuentran aptos para ser trasladados a la fase de aclimatación (Figura 2).

Los indicadores morfológicos de calidad de los brotes al finalizar los tres ciclos de subcultivos en los BIT se muestran en el Cuadro 1. De forma general, la realización de los tres ciclos de proliferación sin la fase de seccionado previo de los brotes, influyó en todas las variables morfológicas de calidad con diferencias significativas en aquellos tratamientos que conllevó el seccionado de los brotes de Tipo I en cada ciclo de proliferación.

La tasa de multiplicación del plátano en los BIT está dada por el número total de brotes de Tipo I, II y III. Cuando se inicia un cultivo bajo estas condiciones experimentales, el explante inicial es un brote

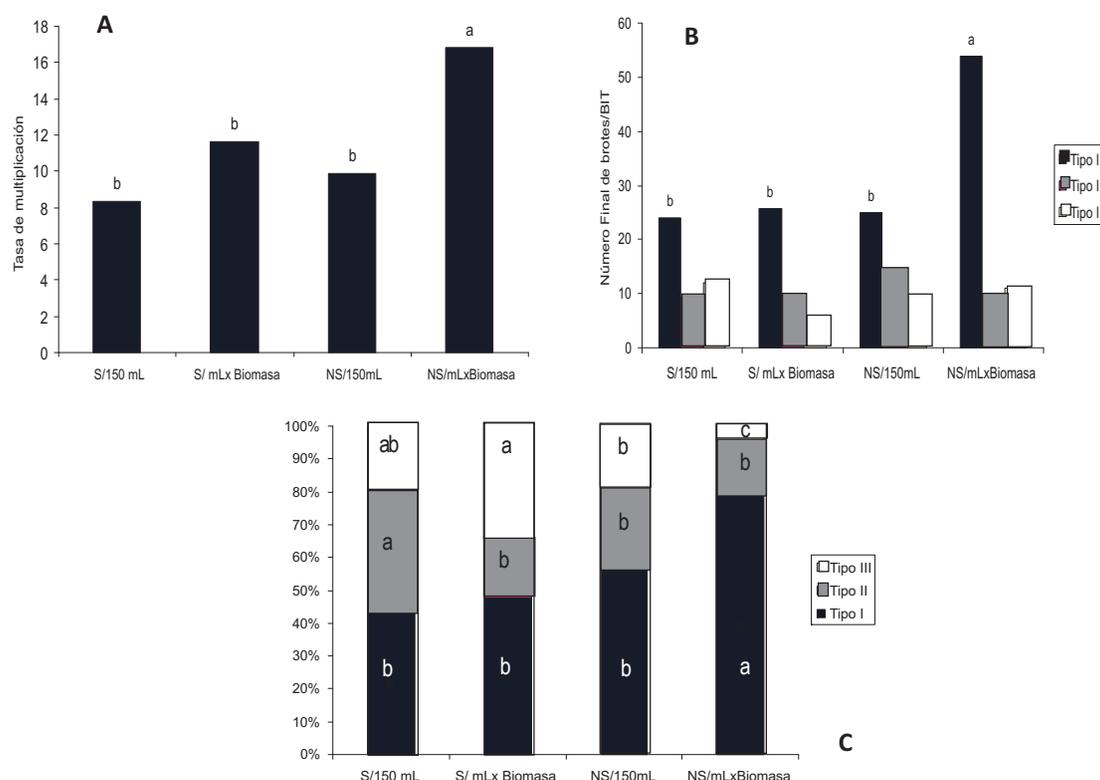


Figura 1. Tasa de multiplicación (A), número final de brotes por BIT (B) y distribución de los tres tipos de brotes después de los tres ciclos en el BIT (C). Para los tratamientos que incluyen seccionado de los brotes la tasa de multiplicación y el número final de brotes es el promedio de los tres ciclos en el BIT. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con un grado de confiabilidad del 5% para la prueba Tukey ( $n=30$ ).

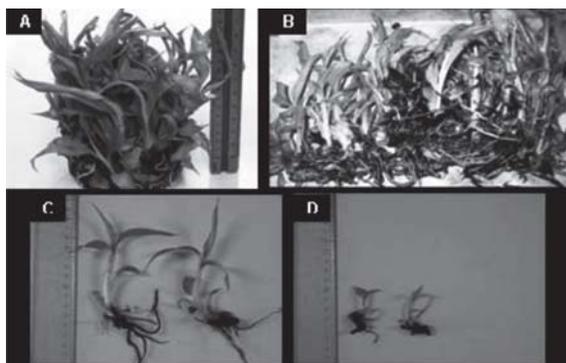


Figura 2. Multiplicación del plátano CEMSA  $\frac{3}{4}$  en los BIT. (A) Explantes de Tipo I sin seccionar después de cada ciclo con 150 ml de medio de cultivo (NS/150 ml). (B) Explantes de Tipo I sin seccionar después de cada ciclo con incremento del volumen de medio en función de la biomasa (NS/mlxBiomasa). (C) Explantes de Tipo I seccionado después de cada ciclo con 150 ml de medio de cultivo (NS/150 ml). (D) Explantes seccionados de Tipo I después de cada ciclo con incremento del volumen de medio en función de la biomasa (S/mlxBiomasa).

de Tipo I, que se divide para obtener dos inóculos (Roels, *et al.*, 2005). Normalmente cada inóculo puede producir al menos un brote de Tipo I y un número variable de brotes de Tipo II y III que se forman a partir de brotes Tipo I, los cuales son removidos en cada ciclo. Ciclos de proliferación consecutivos dis-

minuyen los brotes de Tipo I debido a la continua división del explante en dos partes para la obtención de los inóculos.

Dore Swamy, *et al.* (1983), refieren que la capacidad de proliferación de explantes de *Musa acuminata* está correlacionada con el número de hojas removidas en el explante; así, brotes con una sola hoja producen solamente una planta, mientras que brotes con muchas hojas que encierran yemas generan múltiples plantas, lo cual pudiera ser la respuesta que tuvo la estrategia de no seccionar los explantes de Tipo I.

El seccionamiento del explante, pudiera ser la causa de la aparición de un mayor número de brotes de Tipo II y III. Mante y Tepper (1983) encontraron que cuando se corta el meristemo apical de *Musa textiles* Née en dos partes, una que contiene el brote apical y la otra porción periférica que contenía la base de hoja, desarrollaron más brotes en el segmento alejado de la porción meristemática (presumiblemente asociado a meristemas pre-existentes en la base de la hoja) que en la región del domo apical.

De acuerdo con estos resultados se considera que la calidad de los brotes provenientes del BIT pudiera estar relacionada con el aumento del número de brotes de Tipo I, fundamentalmente cuando no se secciona el explante. El volumen de medio de cultivo parece tener menos influencia en la calidad de los brotes que el seccionado de los mismos.

Cuadro 1. Indicadores morfológicos de los brotes de plátano CEMSA  $\frac{3}{4}$  (AAB) después de tres ciclos en BIT.

| Tratamientos              | Altura del brote (cm) | Diámetro de la base del brote (cm) | Número de hojas/brote | Número de raíces/brote | Masa fresca/brote (g) |
|---------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Explantes NS/150ml        | 11.0 a                | 0.8 a                              | 5.7 a                 | 8.0 a                  | 3.3 a                 |
| Explantes NS/ml x Biomasa | 10.4 a                | 0.8 a                              | 5.0 a                 | 4.9 b                  | 3.4 a                 |
| Explantes S/150ml         | 3.9 c                 | 0.4 b                              | 3.4 b                 | 3.3 c                  | 1.4 b                 |
| Explantes S/ml x Biomasa  | 6.0 b                 | 0.5 b                              | 4.0 b                 | 0.8 d                  | 1.4 b                 |
| Significación             | *                     | *                                  | *                     | *                      | *                     |

Medias con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas con un grado de confiabilidad del 5% para la prueba Tukey (n=30). La media de los tratamientos con explantes seccionados son el promedio de los tres ciclos.

A pesar de esto, el volumen de medio de cultivo por inóculo es un factor que controla la respuesta morfogénica y la calidad de los brotes en el BIT Lorenzo, *et al.* (1998) determinaron un volumen óptimo de medio por explante (50 ml) para la multiplicación de brotes de *Saccharum sp.* Escalona, *et al.* (1999) y Roels, *et al.* (2005) demostraron que existe un volumen óptimo para la proliferación de brotes de piña y plátano, con un aumento en la tasa de multiplicación y calidad de los brotes.

La comprensión del comportamiento y los mecanismos que controlan la organogénesis en medio líquido beneficia grandemente el uso de los biorreactores para la micropropagación comercial. Tanto el microambiente como los factores químicos y físicos son los principales factores involucrados en el control de la morfogénesis en las plantas (Ziv, 2005). Estos estudios básicos y aplicados pueden ofrecer la información necesaria para el uso eficiente y económico de los BIT en la propagación masiva de plantas.

La mejor calidad de los brotes se logró cuando no se seccionaron en cada ciclo, lo cual está acorde con lo planteado por Ziv (2005), cuando refiere que el contacto de toda la planta con los nutrientes permite que la absorción de los mismos se produzca a través de las raíces o de la superficie de las hojas. Quizás este sea uno de los factores responsables para obtener un mayor incremento del *cluster*, lo cual produce una alta proliferación y un rápido crecimiento.

En sentido general, los BIT proveen un rápido y eficiente sistema para la proliferación del plátano, teniendo en cuenta la estrategia de no seccionar el

explante entre cada ciclo. Renovando el medio de cultivo en función del aumento de la biomasa se logra incrementar el número de brotes de Tipo I con una mayor calidad morfogénica. Esto simplifica el protocolo de Roels, *et al.*, (2005) y reduce los costos, lo cual propone un procedimiento compatible con la propagación del plátano a gran escala.

## Bibliografía

- Dore Swamy R., Srinivasa Rao N.K. and Chacko E.K. 1983. Tissue-culture Propagation of Banana. *Scientia Horticulture* 18(3): 247-252.
- Escalona M., Cejas I., González-Olmedo J., Capote I., Roels S., Cañal M.J., Rodríguez R., Sandoval J., y Debergh P. 2003. Efecto de la metatopolina sobre la propagación del plátano utilizando un bioreactor de inmersión temporal. *InfoMusa* 12(2): 28-30.
- Escalona M., Lorenzo J.C., González B., Daquinta M., González J.L., Desjardins Y. and Borroto C.G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) Micropropagation in Temporary Immersion Systems. *Plant Cell Reports* 18(9): 743-748.
- Lorenzo J.C., Luis B., Escalona M., Teisson C., Espinosa P. and Borroto C. 1998. Sugarcane Shoots Formation in an Improved Temporary Immersion System. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54(3): 197-200.
- Mante S. and Tepper H.B. 1983. Propagation of *Musa textilis* Née Plants from Apical Meristem Slices *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2(2): 151-159.
- Martin K.P., Zhang C., Slater A. and Madassery, J. 2007. Control of Shoot Necrosis and Plant Death During Micropropagation of Banana and Plantains (*Musa spp.*) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 88(1): 51-59.
- MINAGRI. 2008. Delegación Provincial de la Agricultura Departamento de cultivos varios. Ciego de Ávila. Informe anual de producción de viandas 2008. 2-7.
- Murashige T. and Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Roels S., Escalona M., Cejas I., Noceda C., Rodríguez R., Cañal, M.J., Sandoval J. and Debergh P. 2005. Optimization of Plantain (*Musa AAB*) Micro Propagation by Temporary Immersion System. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 82(1): 57-66.
- Ziv M. 2005. Simple Bioreactors for Mass Propagation of Plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81(3): 277-285.