

PROTOCOLOS DE ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE MERISTEMOS APICALES EN PLÁTANO DOMINICO HARTÓN (*Musa sp.*)

Mario René López Vera¹, Tania María López Vera², Byron Zevallos¹, Luis Ramos³

1 Carrera de Agrícola, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Calle 10 de agosto N°82 y Granda Centeno, Calceta, Manabí, Ecuador.

2 Carrera de Medio Ambiente, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Calle 10 de agosto N°82 y Granda Centeno, Calceta, Manabí, Ecuador.

3 Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Walter Andrade. Km 1 ½ vía a Santo Domingo, C.P. 73. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

Contacto: mrene782@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue facilitar la micropropagación *in vitro* de plátano variedad dominico hartón. La fase establecimiento aséptico se realizó bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro tratamientos y cinco repeticiones. Cada repetición estuvo conformada por tres frascos con un explante por cada frasco, donde la mejor concentración para el establecimiento aséptico fue el hipoclorito de sodio al 1% por 20 minutos combinado con bicloruro de mercurio al 1% por 5 minutos, obteniéndose el 79.96 % de explantes sanos. La fase de multiplicación *in vitro* se dispuso bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), con tres tratamientos y cuatro repeticiones. Cada repetición tuvo 4 frascos, provistos de un explante, donde la mejor concentración para la proliferación de meristemos apicales fue en un medio de cultivo conformado por las sales MS suplementado con 2,5 mg/l BAP + 0.75 mg/l AIA obteniéndose 4,50 brotes con una longitud de 2,03 cm aproximadamente.

Palabras Claves: Plátano hartón, 6 bencil-aminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA), bicloruro de mercurio, hipoclorito de sodio.

ABSTRACT

The aim of this study was to ease the micro propagation in vitro of the banana variety dominico harton. The aseptic establishment phase the Design was Totally Random (DCA), with four treatments and five repetitions. Each repetition was conformed by three glasses with an explants for each glass, where the best concentration for the aseptic establishment was the hypochlorite sodium at 1% for 20 minutes combined with mercuric chloride at 1% for 5 minutes, obtaining 79.96% of healthy explants. The multiplication In vitro phase the Design was Totally Random (DCA), with three treatments and four repetitions. Each repetition had 4 glasses, provided with one explants, where the best concentration for the meristemos apicales proliferation was a cultivation conformed by the MS salts supplemented with 2.5 mg/l BAP + 0.75 mg/l AIA obtaining 4,50 buds with a longitude of 2,03 cm approximately.

Key words: Banana hartón, indoleacetic acid (AIA), 6 bencil-adenine (BAP), the mercuric chloride, the hypochlorite sodium.

INTRODUCCIÓN

El Ecuador es uno de los mayores productores del cultivo de plátano (*Musa* sp.) en América Latina, con una superficie sembrada de 183.599 Ha (SICA, 2000). La mayoría de las variedades comestible de musas no producen semillas, por lo que su propagación se la realiza por vía asexual; utilizando los hijuelos o retoños del cormo madre, el mismo que es separado para utilizarlo como material de siembra. Sin embargo, los números de hijuelos que se pueden obtener mediante esta metodología convencional es relativamente reducida, facilitando la diseminación de plagas y enfermedades (Macias, F. y Sotomayor, I. 1994).

El cultivo de tejidos es importante no solo porque es parte del área que abarca la Biotecnología sino porque actualmente tiene una mayor aplicación práctica en la agricultura, es una herramienta fundamental en el estudio de los problemas básicos aplicados en la biología. La propagación in vitro se practica con éxito en numerosas especies de plantas, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, entre las que se pueden citar: Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo; reducción del tiempo de multiplicación; posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, un mayor control sobre la sanidad del material que se propaga y la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad en la cual solo existan pocos individuos (Villalobos, M. y Thorpe, A. 1991).

En la industria platanera nacional aún no se ha generalizado el uso de esta tecnología, del clon hartón no se ofrece aún material al mercado, y los productores, a pesar de conocer la existencia del recurso recelan de su uso por desconocimiento de su comportamiento y por presumir un alto precio. De allí la idea de utilizar meristemas originados de áreas de producción y probar su comportamiento en la propagación y aclimatación. (Nava et al., 1998). Con esto antecedentes se plantea los siguientes objetivos: Determinar la concentración óptima de agentes antisépticos y tiempos de desinfección en el control de la

contaminación en meristemos apicales de plátano variedad dominico hartón y establecer la mejor relación de la 6 bencil-aminopurina (BAP) y el ácido indolacético (AIA) en la multiplicación *in vitro* de meristemos apicales en plátano variedad dominico hartón.

Los objetivos de esta investigación fueron: 1. determinar la concentración óptima de agentes antisépticos y tiempos de desinfección en el control de la contaminación en meristemos apicales de plátano variedad dominico hartón, 2. establecer la mejor relación de la 6 bencil-aminopurina (BAP) y el ácido indolacético (AIA) en la multiplicación *in vitro* de meristemos apicales en plátano variedad dominico hartón.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizará en el laboratorio de Biotecnología e invernadero de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicado en el Km. 1.5 vía Quevedo-Santo Domingo de los Colorados, Provincia de los Ríos, ubicado entre las coordenadas geográficas 01° 00' 43.5" de latitud Sur y 79° 28' 09" de longitud Oeste.

Material genético

Como material genético se utilizó en todos los experimentos, meristemos apicales de plátano dominico Hartón (*Musa sp.*), obtenidos a partir de plantas que crecen en campo, bajo condiciones no controladas, y seleccionadas por su calidad fenotípica del fruto.

Materiales y equipo

Mechero de alcohol, papel de aluminio, tijeras, bisturí, pinza, cajas de petri, frascos de 250 ml de capacidad, erlenmeyer (diferentes capacidades), balanza analítica y de precisión, destilador de agua (capacidad de 10 lt/hora), potenciómetro, autoclave vertical, agitador magnético, cámara de flujo laminar horizontal, estufa, y otros.

Reactivos

Murashige y Skoog 1962, Gelificante: Phytigel, ácido clorhídrico 1 N, hidróxido de sodio 1 N, alcohol al 70-90%, sacarosa, myo-inositol, jabón líquido, hipoclorito de sodio en estado líquido (ajax cloro 5%), Bicloruro de mercurio, Carbón vegetal, Tween 20, y otros.

Fase 1: Establecimiento del cultivo aséptico

Diseño experimental

El experimento se desarrolló bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2 (concentraciones de agentes antisépticos) x 2 (tiempos de desinfección), con seis repeticiones. Cada unidad experimental estuvo conformada por cuatro recipientes.

Tratamientos

La combinación de los niveles de los factores en estudio, da como resultado los siguientes tratamientos:

T1= Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 20 % + 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución por 20 minutos + Bicloruro de mercurio (Hg₂Cl) al 1 % + 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución durante 5 minutos, respectivamente.

T2= Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 20 % + 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución por 10 minutos + Bicloruro de mercurio (Hg₂Cl) al 1 % + 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución durante 10 minutos, respectivamente.

T3= Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 10 % + 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución por 20 minutos + Bicloruro de mercurio (Hg₂Cl) al 0.5 % + 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución durante 5 minutos, respectivamente.

T4= Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 10 % + 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución por 10 minutos + Bicloruro de mercurio (Hg₂Cl) al 0.5 % + 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución durante 10 minutos, respectivamente.

Manejo del experimento

Se colectaron ápices de plátano dominico hartón provenientes de campo y seleccionadas por la calidad de su fruto, se lavaron con una solución antiséptica compuesta por jabón líquido neutro al 10 % (v/v), más 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución y posteriormente se procedió a enjuagar por varias veces con agua corriente. En el flujo laminar fueron sometidos los tratamientos mencionados. Al cabo de los primeros 11 días de iniciado el cultivo, se evaluó el porcentaje de explantes contaminados, fenolizados y sanos. La contaminación por hongos se evaluó a través de la presencia de micelios y las bacterias a través de los exudados presente en el explante o en la base de éste, el daño fisiológico se determinó mediante la observación visual de cambio de coloración o aspecto del explante.

Fase 2: Multiplicación *in vitro*

Diseño experimental

El experimento se desarrolló bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 3 (concentraciones óptimas de hormonas), con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo conformada por un bloque de 4 frascos.

Tratamientos

La combinación de los niveles de los factores en estudio, da como resultado los siguientes tratamientos:

T1= MS + 2 mg.l⁻¹ de BAP + 0.75 mg.l⁻¹ de AIA

T2= MS + 3 mg.l⁻¹ de BAP + 0.75 mg.l⁻¹ de AIA

T3= MS + 4 mg.l⁻¹ de BAP + 0.75 mg.l⁻¹ de AIA

Manejo del experimento

En este experimento se utilizó ápices de plátano dominico hartón cultivados *in vitro* provenientes de la fase anterior. Los mismos que presentaron una altura 1.5 cm aproximadamente. Estos explantes fueron colocados en frascos de vidrio que contenían 25 ml del medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con sacarosa 3% (p/v), myo-inositol 100mg.L⁻¹, tiamina. HCL 1.0 mg.l⁻¹ y la correspondiente combinación de reguladores de crecimiento. Los tratamientos a evaluado fueron los

mencionados. Las variables analizadas en este experimento fueron: días a brotación, número de brotes por explante, tamaño de brotes. Esto se llevó a cabo cuando más del 50 % de los explantes iniciaron las brotaciones en cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1: Establecimiento del cultivo aséptico

1. Explantes contaminados

En el análisis estadístico de la variable explantes contaminados por hongos no reporto diferencia estadísticas entre los tratamientos (figura 1), pero cabe resaltar que la mejor repuesta se obtuvo con el tratamiento dos con un promedio de 13.32 % de explantes contaminados por hongos.

Mientras que para la variable explantes contaminados con bacterias reporto diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos (figura1). El tratamiento uno con 6.66 %, fue el que mejor repuesta presento con respecto a los otros tratamientos, pero es estadísticamente igual al tratamiento tres y diferentes estadísticamente a los otros tratamientos.

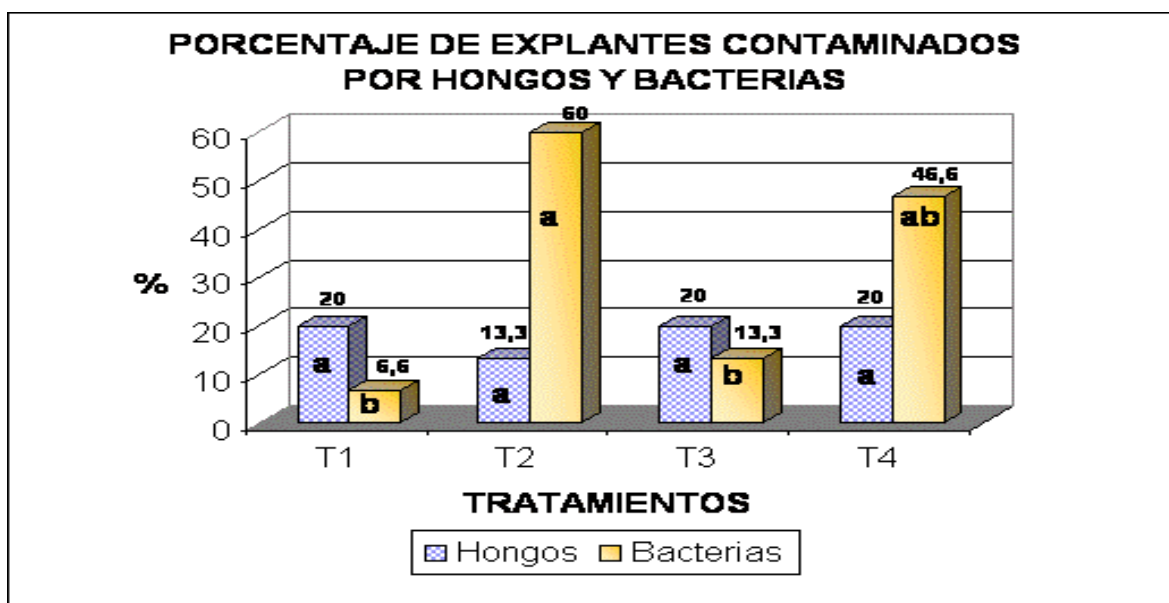


Figura 1. Porcentaje de explantes contaminados por hongos y bacterias en la fase de establecimiento *In vitro* de plátano variedad dominico hartón (*Musa* sp.) Laboratorio de Biotecnología. UTQ.

El porcentaje de explantes contaminados por hongos no fue influenciado por los tratamientos, pero se obtuvo el menor porcentaje de contaminación donde se combinaron la mayor concentración de hipoclorito de sodio con la mayor concentración de bicloruro de mercurio, este último con el mayor tiempo de exposición, resultado que ratifica que el bicloruro de mercurio es un desinfectante muy fuerte y que empleado en concentraciones relativamente bajas y por un tiempo prudencial tiene un efecto muy tóxico sobre cualquier célula viva (Roca, W. y Mroginski, L. 1993).

En el análisis general de los explantes contaminados por bacterias se observó que existieron diferencias en el efecto de los tratamientos sobre los explantes, se obtuvo el menor porcentaje de contaminación por bacterias utilizando en combinación hipoclorito de sodio 1% y bicloruro de mercurio 1%, corroborando con ello el uso frecuente de estos productos en concentraciones similares para la desinfección de explantes de plátano (Reyes, X. 2003).

2. Explantes fenolizados

La variable explantes Fenolizados presento diferencias estadística significativas entre los tratamientos, correspondiendo el menor porcentaje de explantes fenolizados al tratamiento tres con 6.66 %, pero mostró igualdad estadística con el tratamiento uno y cuatro y diferencias con el tratamiento dos (figura 2).

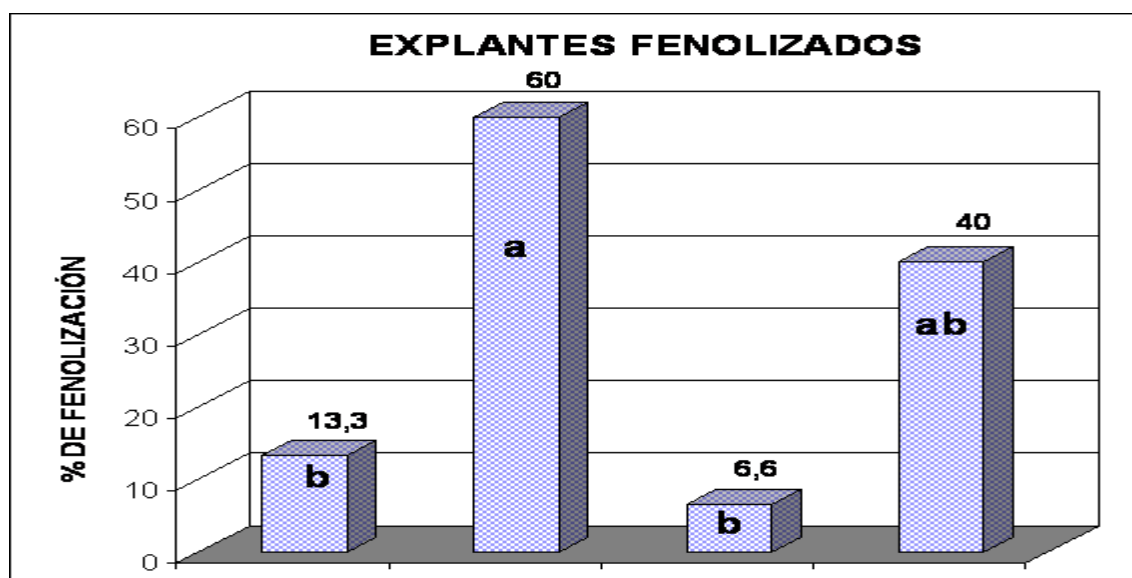


Figura 2. Porcentaje de explantes fenolizados en la fase de establecimiento *in vitro* de plátano variedad dominico hartón (*Musa sp.*) Laboratorio de Biotecnología. UTQ.

Analizando los resultados de los explantes fenolizados, se encontraron diferencias entre los tratamientos utilizados, a pesar de que fueron sometidos todos los explantes a igual concentración de antioxidantes, el menor porcentaje de fenolización se obtuvo en el T₃. Lo que coincide que las sustancias químicas más utilizadas como antioxidantes no eliminan la oxidación fenólica, que liberan los tejidos del explante cuando sufren heridas (Zimmerman, R. 1985). Siendo esto un indicador del rejuvenecimiento o madurez del tejido (Fernández, J., Lorenzo, L., *et al.*, 1999).

3. Explantes sanos

En el análisis estadístico de la variable explantes sanos se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos correspondiendo el mejor promedio al tratamiento uno con 79.96 % de explantes sanos, siendo estadísticamente igual al tratamiento tres y diferente estadísticamente al resto de tratamientos.

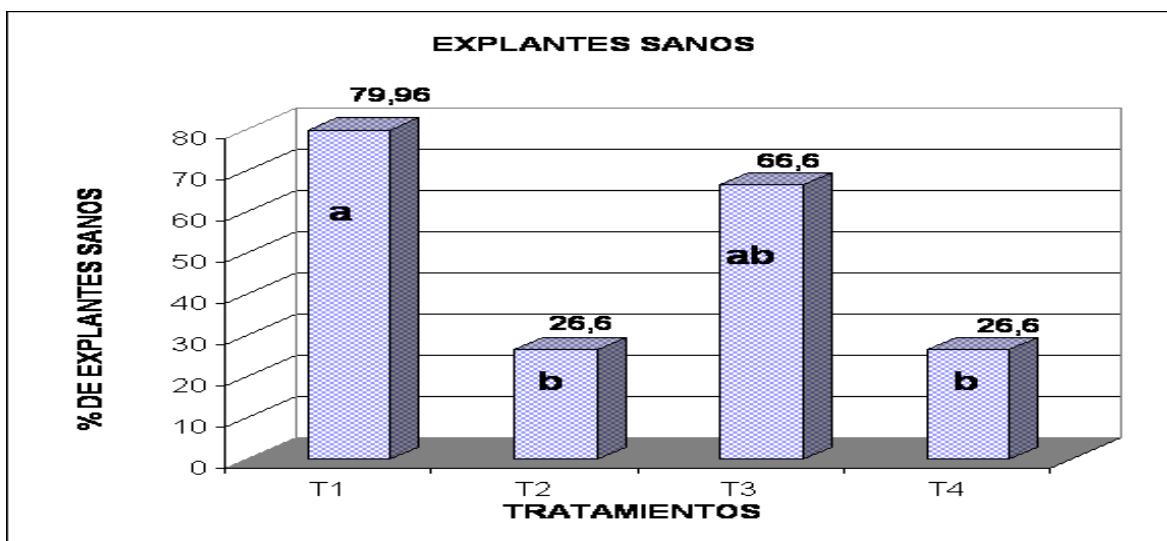


Figura 3. Porcentaje de explantes sanos en la fase de establecimiento *In vitro* de plátano variedad dominico hartón (*Musa sp.*) Laboratorio de Biotecnología. UTQ.

Por otro lado los valores de la variable explantes sanos nos muestra diferencias en el efecto de los diferentes tratamientos a que fueron sometidos los explantes, lo que concuerda con que los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociados a los tejidos de la planta *in vivo*, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos (Cassells, A. 1991).

Fase 2: Multiplicación *In vitro*

1. Número de brotes

En el análisis estadístico de la variable número de brotes, no reporto

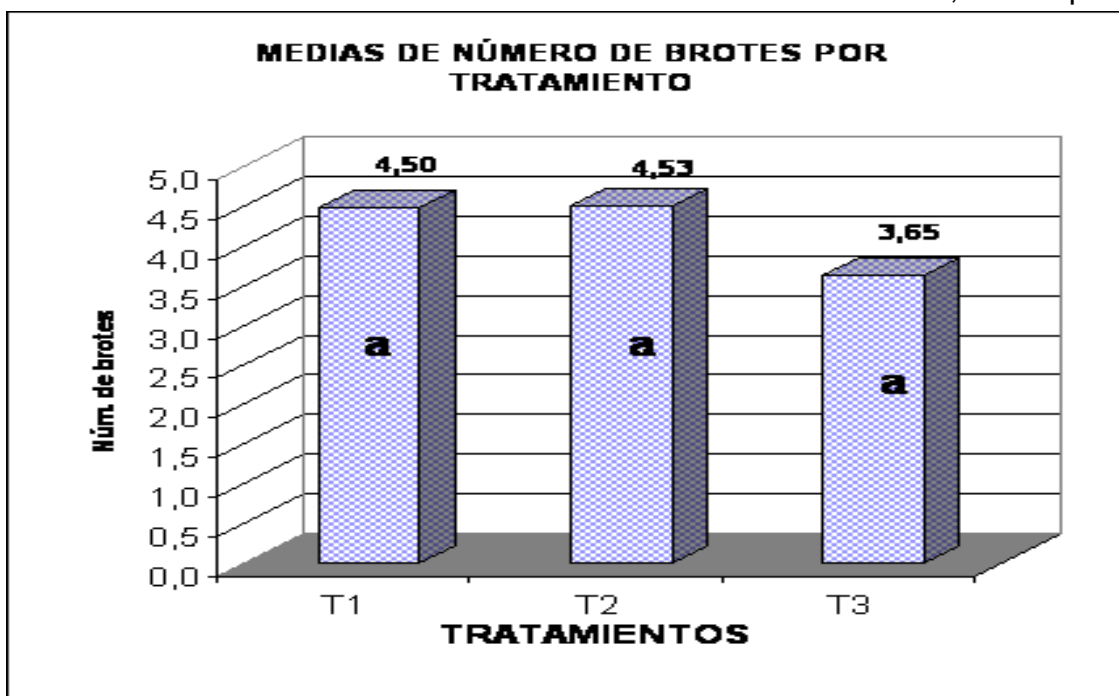


Figura 4. Medias de número de brotes en la fase de multiplicación *in vitro* de plátano variedad dominico hartón (*Musa* sp.) Laboratorio de Biotecnología, UTQ.

Los resultados obtenidos en la variable número de brotes indicaron claramente que el tratamiento que mejor respuesta presento fue el T2. Este resultado se asemeja a los de Reyes, X. (2003), quien obtuvo el mayor número de brotes con 2.5 mg/L de BAP + 0.75 mg/L de AIA en la Micropropagación de plátano variedad barraganete. Y difiere a los obtenidos por Macías, F. y Sotomayor, I. (1994), el cual obtuvo los mejores resultados al adicionar al medio de cultivo 3 mg/l BAP en la propagación *In vitro* de musáceas.

Estos valores permiten afirmar que el número de brotes está vinculado con la concentración de citoquinina empleada, ya que en el tratamiento T2 donde se utiliza en el medio de cultivo una concentración intermedia de citoquinina se obtiene un mayor número de brotes. Numerosos autores reconocen que el balance apropiado entre citoquinina/auxina en el medio de cultivo es necesario para la formación de brotes meristemáticos, este balance está determinado por las concentraciones endógenas de citoquinina presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante (Jiménez, E. 1998; Skoog, F. y Miller, C. 1996). Sin embargo cuando se aumentó la concentración de citoquinina/auxina no se logró aumentar el número de brotes para la variedad en estudio.

2. Longitud de brotes

En el análisis estadístico de la variable longitud de brotes, no reporto diferencias estadísticas en ninguno de los tratamientos analizados (figura 5).

Para la variable longitud de brotes el tratamiento T1 con 2.03 fue el que alcanzo el mayor promedio pero estadísticamente fue igual a los demás tratamientos (figura 5).

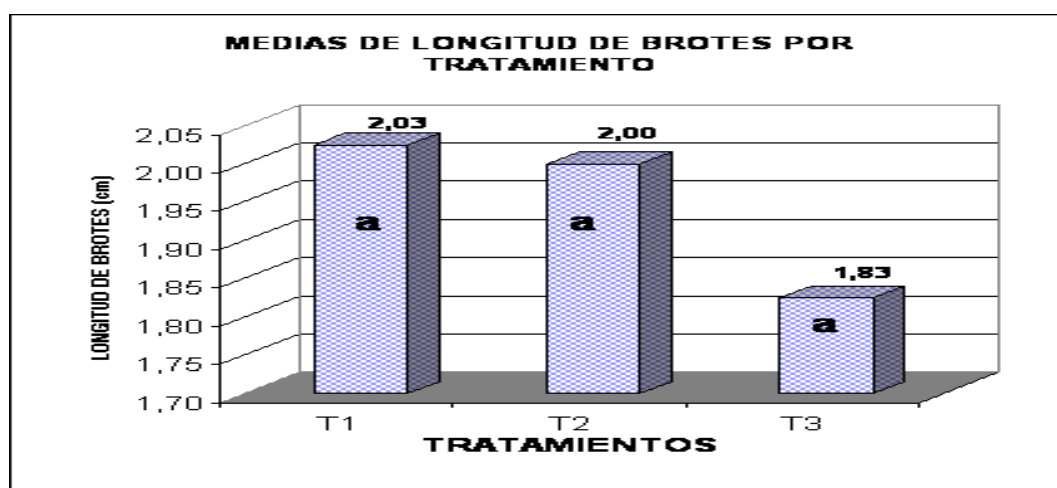


Figura 5. Medias de la longitud de brotes en la fase de multiplicación *in vitro* de plátano variedad dominico hartón (*Musa sp.*) Laboratorio de Biotecnología, UTQ.

Es de destacar que en el tratamiento T₁, donde existe la menor concentración de citoquinina/auxina exógena, propicia la elongación de brotes meristemáticos. Es probable que en estos explantes exista un balance

hormonal endógeno favorable a las auxinas, por ser el meristemo apical un órgano vegetativo y punto de síntesis de ellas pues al aplicar una combinación exógena de reguladores de crecimiento con un menor nivel de citoquinina/auxina (T_1), se observa que aumenta la longitud del brote. Mientras tanto, al utilizar concentraciones más elevadas de citoquininas/auxinas en el resto de tratamientos (T_2 y T_3), la longitud del brote disminuye.

En la literatura se reconoce al ácido indol-3-acético (AIA), como un regulador de crecimiento con carácter auxínico fuerte que estimula principalmente la elongación celular de muchas especies vegetales (Leopold, C. y Kriedeman, N. 1995). A pesar que los mejores resultados en la variable número de brotes se obtuvieron con el tratamiento T_2 , fueron iguales estadísticamente a T_1 , tratamiento que obtuvo la mejor longitud de brotes con una relación hormonal inferior y por lo tanto más factible económicamente por lo que asumo que T_1 es el mejor tratamiento para la fase de multiplicación.

CONCLUSIONES

La fase de establecimiento aséptico es fundamental para el éxito de un protocolo de micropropagación *in vitro* de cualquier especie vegetal. Para la desinfección adecuada de explantes es importante utilizar productos, concentraciones y tiempo de exposición de forma inalterable. Los desinfectantes utilizados no eliminan por igual hongos y bacterias por lo que se debe escoger el que lo haga en mejores proporciones, para ambos casos. En la desinfección, se observó la posible influencia de los productos y sus concentraciones sobre la fenolización de los explantes. La concentración óptima de agentes antisépticos para la desinfección de meristemos apicales de plátano dominico hartón es hipoclorito de sodio al 1% por 20 minutos combinado con bicloruro de mercurio al 1% por 5 minutos. La relación de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo influye en la tasa de proliferación de los brotes meristemáticos. Se encontró en el tratamiento T_2 (3,0 mg/L BAP + 0,75 mg/L AIA) un mejor promedio de brotes por explante. A pesar de obtener el mejor promedio de brotes en T_2 , los del T_1 son más grandes.

LITERATURA CITADA

- 1.- Casells, A. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In: P. Debergh y R. H. Zimmerman (eds). Micropropagation, pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- 2.- Censo Nacional Agropecuario. III. Resultados Nacionales y Provinciales. El proyecto Servicio de Información y Censo Agropecuario (**SICA**). 2000. Dirección URL <http://www.sica.gov.ec> (Consulta: 10 feb. 2004).
- 3.- Fernández, J., Lorenzo, L., Rigueiro, A., Ballester, A. 1999. Phenols as markers of juvenile tissues in mature trees. *Tree Physiology* 19: 461-466
- 4.- Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. In: Pérez Ponce (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Villa Clara. Cuba.
- 5.- Leopold, C. y Kriedeman, N. 1995. Plant growth and development. Mc Graw-Hill Book Co., 2^a. ed., U.S.A.
- 6.- Macias, F. y Sotomayor, I. 1994. Propagación *in vitro* de Musáceas. INIAP – EET “Pichilingue”. Boletín Técnico. N° 245. Quevedo – Ecuador. 11p.
- 7.- Nava, C., Villareal, E. y Villalobos, R. 1998. Comportamiento de las plántulas del clon de plátano Hartón (*Musa* AAB) en el Sur del Lago de Maracaibo¹. Revista de la facultad de Agronomía, Universidad del Zulia de Maracaibo – Venezuela. Dirección URL <http://www.microsoft.com/isapi/redir.htm> (consulta: 20 feb. 2004)
- 8.- Reyes, X. 2003. Micropropagación de plátano variedad Barraganete. Tesis de ingeniería. Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo- Ecuador. Dirección URL <http://www.utq.edu.ec/eventos/investigación/index,htm> (consulta: 20 de jul. 2005)
- 9.- Roca, W. y Mroginski, L. 1993. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia.

- 10.- Skoog, F. y Miller, C. 1996. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., 9, 118-131.
- 11.- Villalobos, y Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: Conceptos, Metodología y resultados. In: W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds), Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. pp. 127 – 141.
- 12.- Zimmerman, R. 1985. Application of tissue culture propagation to woody plants. In: Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. by R. R. Henke; K. W. Hughes; M. J. Constantin; A. Hollaender. New York, Plenum Press. 165-177 p.

ANEXO

Anexo 1. Proceso biotecnológico de la fase de establecimiento *in vitro*, a) establecimiento aséptico de la siembra, d) proceso de incubación y aclimatación del explante aséptico en fase experimental.



b

Anexo 2. Proceso biotecnológico de la fase de multiplicación *in vitro*, a) Brotes axilares de dominico hartón b) vitroplantas listas para fase de enraizamiento.

