

Influencia del Tamaño de Explante en la Propagación *in vitro* de Cuatro Cultivares de *Musa*¹

J.A. Sandoval*, L.E. Müller*

ABSTRACT

The research was carried out using four sizes of explants, with an initial length of 1, 2, 5 and 10 mm and an average fresh weight of 3, 9, 15 and 60 mg respectively. As explant, the apical bud of the corm was used. The influence of the size of the explant on increase in longitudinal growth and fresh weight was evaluated, as well as the degree of phenolic oxidation and percentage of survival. The most appropriate length for culture initiation was found to be 5 mm. Observations revealed that larger explants had a lower rate of survival and stronger phenolic oxidation.

COMPENDIO

Se investigaron cuatro explantes de 1 mm, 2 mm, 5 mm y 10 mm de longitud, con un peso inicial promedio de 3 mg, 9 mg, 15 mg y 60 mg, respectivamente. La parte de la planta utilizada como explante fue la yema apical del cormo. Se relacionó el tamaño del explante con el crecimiento longitudinal, aumento de peso fresco, grado de oxidación fenólica y porcentaje de supervivencia. Se encontró que el tamaño de ápice más apropiado para el cultivo fue la dimensión longitudinal correspondiente a 5 milímetros. Además, con un tamaño mayor del explante, el porcentaje de supervivencia fue menor y el incremento de la oxidación fenólica mayor.

Palabras claves: *Musa*, micropropagación, tamaño de explante.

INTRODUCCION

El banano (*Musa* AAA) y el plátano (*Musa* AAB) son frutos de gran aceptación en mercados internacionales y constituyen también una fuente alimenticia muy importante en los países tropicales. Su exportación contribuye a la captación de divisas y a la generación de empleo

La propagación comercial de los tipos comestibles es asexual, ya que no producen semillas y si las poseen generalmente no son viables. Los hijuelos del cormo madre son separados para utilizarlos como propágulos. Sin embargo, la tasa de multiplicación es baja cuando se utilizan métodos de propagación convencional. Se han realizado varios intentos para aumentar la tasa de multiplicación (2, 10, 20). Actualmente, la atención está centrada en las ventajas del uso de la micropropagación *in vitro*, por medio del cultivo de

tejidos (9, 14, 18, 24, 26). En esta técnica, la parte de la planta utilizada para iniciar un cultivo es lo que se conoce como explante, el cual debe poseer un tamaño inicial óptimo (11). Durzan (6) menciona que la viabilidad del explante y el potencial de organogénesis se conocen en muchas especies, pero no en todas. Así, el crecimiento de un explante puede presentar diferentes comportamientos del de otra especie, inclusive de otro clon de la misma especie. El mismo autor señala que para lograr el éxito en un cultivo se deben considerar los siguientes factores: fuente del inóculo, tamaño y patrón de crecimiento de la planta madre, edad del explante además de la posición del explante en el medio de cultivo, microambiente y totipotencia de las células.

Hu y Wang (11) indicaron que la presencia de primordios foliares determina la capacidad de desarrollo del explante. El lento crecimiento de explantes constituidos únicamente por el domo apical (meristema) sugiere una dependencia de la regulación hormonal exacta. Según Kassanis y Varma (17), los meristemas de papa (*Solanum* sp.) de 0.1 mm con un primordio foliar muestran un mejor crecimiento que cuando se cultivó el meristema sin presencia del primordio. Kartha y Gamborg (16) cultivaron meristemas de yuca (*Manihot* sp.) y encontraron que cuando la dimensión del explante era mayor que 0.2 mm, se lograba la diferenciación de una planta completa. Con tamaños

1 Recibido para publicación el 20 de marzo de 1990. Los autores agradecen a la Agencia Internacional para el Desarrollo (AID) de los Estados Unidos de América, por su ayuda a la investigación mediante el Grant 936-5542, *Innovative Scientific Research*.

* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, C R

inferiores a 0.2 mm, la respuesta consistió únicamente en la formación de callo o rizogénesis.

Caplin (3) señaló que explantes grandes pueden producir más cantidad de tejido nuevo en un tiempo determinado, debido a que el contenido de reservas es mayor que el encontrado en un explante pequeño. Para el caso específico de *Musa*, Jarret, Rodríguez y Fernández (13) utilizaron ápices con una dimensión de aproximadamente de 2 mm a 3 mm de diámetro y obtuvieron resultados satisfactorios. Estos autores informaron que a las cuatro semanas de permanencia en el medio de iniciación, los explantes incrementaron su tamaño de tres a cinco veces en relación con el tamaño inicial.

De Guzmán, Decena y Ubalde (5) investigaron en *Musa* la obtención de mutantes por medio de la irradiación de tejidos *in vitro*. Emplearon diversos tipos de explante y para el cultivo de ápices usaron un tamaño igual a cinco milímetros. Banerjee y De Langhe (1), al iniciar el cultivo de material que posteriormente fue conservado *in vitro* en condiciones de temperatura relativamente baja, usaron un tamaño de explante de 2 mm a 3 mm de largo con dos a tres primordios foliares aproximadamente.

Ma y Shii (19) lograron en banano una rápida multiplicación clonal al cultivar ápices vegetativos de 5 mm de longitud por 3 mm de diámetro.

Vuylsteke y De Langhe (25) utilizaron ápices de 1 mm a 2 mm, e informaron que tales tamaños poseen uno a tres primordios foliares. Novak *et al.* (22) cultivaron ápices con diámetro basal de 2 mm a 3 mm, con uno a cuatro primordios foliares aproximadamente.

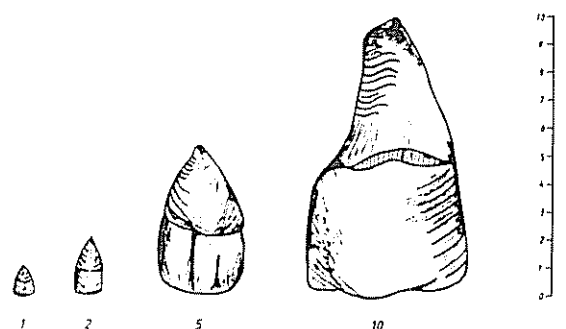
Es evidente que el tamaño del explante es uno de los factores que determina el éxito de la micropropagación. En *Musa*, la falta de una investigación detallada y concordante ha motivado la realización del presente trabajo, con el objetivo de determinar el tamaño de explante (ápice vegetativo) más adecuado para su propagación *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Cormos de Curraré (AAB), Dominico (AAB), Valery (AAA) y Gran Enano (AAA) se extrajeron de plantas cultivadas en campo. Se eliminaron las partes externas del cormo y vainas foliares hasta obtener secciones de aproximadamente 5 cm de largo y diámetro, que contenían el ápice vegetativo. Este material fue sometido a una primera desinfección con hipoclorito de sodio (blanqueador comercial Ajax Cloro) sin diluir, durante 20 min, seguido por dos

lavados de cinco minutos cada uno con H₂O estéril. En condiciones asépticas, se redujo el tamaño del material aún más hasta 2 cm aproximadamente. Este explante consistió en una parte del cormo y varias vainas foliares envolventes del meristema.

Seguidamente, se realizó una segunda desinfección por espacio de 10 min con hipoclorito de sodio (blanqueador Ajax Cloro) al 10% (v/v) más dos gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución desinfectante. Se practicaron dos lavados de 3 min cada uno con agua destilada esterilizada y se procedió en condiciones estériles a reducir el tamaño de los ápices hasta el requerido para el experimento. Estos tamaños fueron de 1 mm, 2 mm, 5 mm y 10 mm de longitud, y se varió el diámetro de la base de acuerdo con la longitud. El peso inicial promedio fue de 3 mg, 9 mg, 15 mg y 60 mg, respectivamente (Fig 1). Para cada cultivar y tamaño se usaron 20 repeticiones.



Leyenda:

1 = longitud 1 mm y peso 3 mg; 2 = longitud 2 mm y peso 9 mg; 5 = longitud 5 mm y peso 15 mg; 10 = longitud 10 mm y peso 60 miligramos.

Fig 1 Representación esquemática de las medidas iniciales de los explantes de *Musa*

Antes de su inoculación, los explantes fueron sometidos a un tratamiento antioxidante mediante la permanencia, durante 10 min, en una solución acuosa estéril de cisteína-HCl (50 mg l⁻¹).

Los explantes se cultivaron en el medio inorgánico de Murashige y Skoog (21) suplementado con: sacarosa, 30 g l⁻¹; mio-inositol, 100 g l⁻¹; ácido nicotínico, 0.5 mg l⁻¹; piridoxina-HCl, 0.5 mg l⁻¹; 6-bencilaminopurina (BA), 1 mg l⁻¹; y Bacto Agar (Difco), 7 g l⁻¹. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH 0.1 N antes de colocar alícuotas de 10 ml en tubos de vidrio de 11 cm x 2.5 centímetros. La esterilización se realizó en autoclave a una presión de 1.05 kg/cm² durante 15 minutos.

Los cultivos se incubaron a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 70% de humedad relativa, bajo un fotoperíodo de 16/8 horas. Como fuente de luz sirvieron lámparas fluorescentes del tipo "luz de día", que emitían una iluminancia de 2.500 *lux* al nivel de los cultivos. El período de incubación fue de dos meses, durante los cuales se realizaron cuatro lecturas de crecimiento longitudinal con regla milimétrica, a intervalos de 15 d cada una. Además se relacionó el tamaño del explante con la tasa (%) de supervivencia y se estimó visualmente con escala relativa el grado de oxidación de los explantes. Para determinar la razón del aumento en peso en relación con el peso fresco inicial, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento relativo} = \frac{\text{peso fresco final} - \text{peso fresco inicial}}{\text{peso fresco inicial}}$$

Las determinaciones de peso se realizaron en una balanza electrónica (Mettler PE 360) en condiciones asépticas. Los datos fueron sometidos al análisis de variancia.

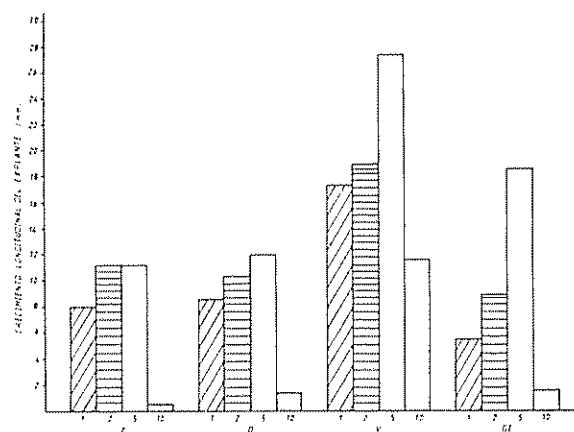
RESULTADOS Y DISCUSION

Los aumentos de tamaño aparecen en la Fig. 2 para cada dimensión de explante inicial y para cada cultivar investigado.

Se observa una correlación positiva entre el crecimiento del explante y el tamaño inicial, a excepción del correspondiente a 10 mm, en el cual el crecimiento longitudinal fue muy bajo. En este tamaño, los explantes mostraron más bien un aumento de grosor desproporcionado en la parte basal, y en la mayoría de los casos no se observó crecimiento apical pronunciado. La mayor respuesta en cuanto a crecimiento se dio con el tamaño de 5 mm para los cuatro cultivares analizados, y se obtuvo luego una diferenciación de plántulas completas.

Los tamaños de 1 mm y 2 mm mostraron un rápido crecimiento inicial hasta cumplir tres semanas. Sin embargo, posteriormente no crecieron más, ni en sentido longitudinal ni radial. Cabe destacar que aunque el ápice presentaba un buen aspecto, no se logró la formación de plántulas completas con tamaños de explante menores que dos milímetros.

Los cultivares Curraré (AAB) y Dominico (AAB) presentaron un porte de crecimiento muy similar, y los cultivares Valery (AAA) y Gran Enano (AAA) difirieron. Además es evidente que el crecimiento lon-



Leyenda:

1, 2, 5, 10 = tamaño inicial de los explantes en milímetros.

Fig. 2 Crecimiento longitudinal de los explantes de *Musa* a los 60 d de cultivo para los cultivares Curraré (C), Dominico (D), Valery (V) y Gran Enano (GE).

gitudinal fue mayor en los bananos (AAA) que en los plátanos (AAB) para la dimensión inicial correspondiente a 5 mm (Fig. 2).

Las relaciones de aumento de peso se muestran en el Cuadro 1. Existe una estrecha relación entre aumento de peso y crecimiento en longitud (Cuadro 1 y Fig. 2). La ganancia de peso tendió a disminuir conforme se incrementaba el peso fresco inicial del explante. Resultados similares fueron informados por Gadgil y Das (7) al trabajar con *Althaea rosea*. En el Cuadro 1 se evidencia que los tamaños más pequeños lograron una proporción de masa similar. Se observa también una clara supremacía de ganancia de peso para el tamaño de 5 milímetros. El tamaño de 10 mm aumentó considerablemente su masa; sin embargo, longitudinalmente, creció muy poco (Cuadro 1 y Fig. 2).

En el cultivo *in vitro* de *Musa* es frecuente la aparición de coloraciones oscuras en el medio de cultivo. Tales tonalidades se deben a la presencia de sustancias fenólicas y polifenólicas en el explante que se difunden hacia el medio, especialmente si se cultivan secciones de frutos o ápices (5). Los productos de oxidación de estas sustancias generalmente inhiben el crecimiento y con frecuencia son responsables de la muerte de los explantes. Los resultados en cuanto a la severidad de la oxidación de estas sustancias fenólicas en los diversos tamaños de explante se indican en el Cuadro 2.

En este experimento se observó un incremento en la intensidad de oxidación fenólica del explante a medida

Cuadro 1. Promedio de peso inicial, final y aumento de peso a los 60 días de cultivo para cada tamaño de explante y tasa de crecimiento relativo.

Cultivar	Tamaño inicio del explante (mm)	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Aumento de peso (mg)	Tasa de crecimiento relativo
Curraré	1	3	32	29	9.7
	2	9	56	47	5.2
	5	14	133	119	8.6
	10	62	159	97	1.6
Dominico	1	3	30	27	9.0
	2	9	55	46	5.1
	5	15	125	110	7.3
	10	60	152	92	1.5
Valery	1	3	49	46	15.3
	2	8	105	97	12.1
	5	15	127	112	7.5
	10	60	145	85	1.4
Gran Enano	1	3	33	30	10.0
	2	10	99	89	8.9
	5	15	125	110	7.3
	10	61	160	99	1.6

Cuadro 2. Grado de oxidación fenólica relacionada con el tamaño del explante, a los 60 días de cultivo.

Tamaño explante (mm)	Curraré	Dominico	Valery	Gran Enano
1	1	1	2	2
2	2	1	2	2
5	2	2	2	2
10	3	3	3	3

Notas:

- 1 Sin oxidación.
- 2 Oxidación leve.
- 3 Oxidación fuerte.

que aumentó su tamaño. Fue evidente en el medio gelificado la aparición de tonalidades café, casi negras, como consecuencia de la difusión de estas sustancias. Al trabajar con explantes relativamente grandes, se está manipulando un volumen mayor que, al ser inoculado, presenta más cantidad de compuestos en oxidar. Se determinó que el grado de oxidación fue mayor para los genotipos Valery y Gran Enano (AAA) en comparación con los plátanos Curraré y Dominico (AAB). Esto concuerda con lo indicado por Simmonds (23), quien manifestó que frecuentemente la oxidación fenólica es más intensa en los cultivares con genoma AAA que en los de genoma AAB y ABB.

Varios autores (8, 12, 15) informaron que el tamaño del explante determina la supervivencia, crecimiento y tasa de multiplicación de los cultivos. En el Cuadro 3 se cuantifica la tasa de supervivencia *versus* pérdidas por contaminación, relacionadas con el tamaño del explante. Se nota que los tamaños de 1 mm, 2 mm y 5 mm presentaron poca contaminación. La tasa más baja de supervivencia se presentó en el tamaño de 10 milímetros. Estos resultados difieren de los obtenidos por Dale (4), quien al cultivar ápices de varias gramíneas, encontró una correlación positiva entre el tamaño del ápice y el porcentaje de supervivencia.

Este autor concluyó que a mayor tamaño del ápice es menor la posibilidad de mortalidad. Sin embargo,

Cuadro 3. Porcentaje de supervivencia de los explantes con respecto a la pérdida por contaminación.

Cultivar	Tamaño del explante (mm)			
	1	2	5	10
Valery	90	65	70	55
Gran Enano	95	85	100	40
Curraré	95	100	80	70
Dominico	100	100	100	90
Promedio	95	88	88	64

según George y Sherrington (8), explantes grandes pueden presentar problemas de desinfección y tornarse menos manipulables. En los casos en que se observó contaminación, la causa fue la presencia de bacterias que luego indujeron una putrefacción acuosa de los explantes, lo cual provocó que el medio de cultivo se tornara amarillento y que después ocurriera la muerte de los explantes.

CONCLUSIONES

Basados en las condiciones de la presente investigación, y de acuerdo en los resultados obtenidos, se puede concluir lo siguiente:

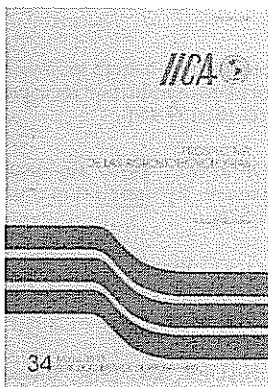
- El tamaño de ápice más apropiado para el cultivo *in vitro* en los cuatro cultivares estudiados fue el correspondiente a 5 milímetros.
- Hubo una tendencia a una menor probabilidad de supervivencia del material conforme aumentó el tamaño del explante.
- Al utilizar tamaños de explantes pequeños (mm), se minimiza el problema de la desinfección y contaminación del medio con productos de oxidación del material; sin embargo, después de que el explante adquiere cierto desarrollo, detiene su crecimiento sin diferenciarse en la planta.

LITERATURA CITADA

1. BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Reports* 4:351-354.
2. BARKER, W.G. 1959. A system of maximum multiplication of the banana plant. *Tropical Agriculture* 36(4):275-284.
3. CAPLIN, S.M. 1963. Effect of initial size on growth of plant tissue cultures. *American Journal of Botany* 50(1):41-94.
4. DALE, P.J. 1977. Meristem tip culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum*, and *Dactylis*. *Plant Science Letter* 9:333-338.
5. DE GUZMAN, E.; DECIENA, A.; UBALDE, E. 1980. Plantlet regeneration from unirradiated and irradiated banana shoot tip tissues cultured *in vitro*. *Philippine Agriculturist* 63(2):140-146.
6. DURZAN, D.J. 1984. Special problems: Adult vs juvenile explants. In *Handbook of Plant Cell Culture: Crop Species*. W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato, Y. Yamada (Eds.) New York, MacMillan Publ. 644 p.
7. GADGIL, F.E.; DAS, D.R. 1963. Variability in tissue growth as a function of explant weight. In *Plant Tissue and Organ Culture, a Symposium*. The University of Delhi. p 136-143.
8. GEORGE, F.E.; SHERRINGTON, D.P. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Inglaterra, Exegetics p. 177.
9. GUPTA, P. 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6:33-39.
10. HAMILTON, K.S. 1965. Reproduction of banana from adventitious buds. *Tropical Agriculture* 42(1):69-73.
11. HU, C.; WANG, P.J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In *Handbook of Plant Cell Culture: Techniques for Propagation and Breeding*. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada (Eds.) New York, MacMillan Publ. p. 201.
12. HUSEEY, G. 1980. *In vitro* propagation. In *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. D.S. Ingram, J.P. Helgeson (Eds.) Cambridge, Scientific Publ. p. 51-61.
13. JARRET, L.R.; RODRIGUEZ, W.; FERNANDEZ, R. 1985. Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of "Saba" and "Pelipita" plantains in Costa Rica. *Scientia Horticulturae* 25:137-147.
14. JARRET, L.R.; RODRIGUEZ, W.; FERNANDEZ, R. 1986. *In vitro* propagation and genetic conservation of bananas and plantains. In *IBPGR Advisory Committee on In Vitro Storage: Report of the Third Meeting (Appendix)*. Roma, International Board for Plant Genetic Resources. p. 15-33.
15. KAHN, P.R. 1976. Aseptic plantlet culture to improve the phytosanitary aspects of plant introduction for asparagus. *Plant Disease Reporter* 60(6):459-461.
16. KARTHA, K.K.; GAMBORG, O.L. 1975. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. *Phytopathology* 65:826-828.
17. KASSANIS, B.; VARMA, A. 1967. The production of virus-free clones of some British potato varieties. *Annals of Applied Biology* 59:447-450.
18. KRICKORIAN, A.D.; CRONAUER, S.S. 1984. Banana. In *Handbook of Plant Cell Culture: Crop Species*. W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato, Y. Yamada (Eds.) New York, MacMillan Publ. p. 327-348.
19. MA, S.S.; SHIH, C.T. 1972. *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *China Horticulture* 18 (3):135-142.
20. MOLINA, M. s.f. Sistema de propagación rápida de banano (*Musa AAA*). *ASBANA (Costa Rica)* 2(28):12-15.
21. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
22. NOVAK, F.; AFZA, R.; PHADVIBULYA, V.; HERMELIN, I.; BRUNNER, H.; DONINI, B. 1985. Micropropagation and radiation sensitivity in shoot tip cultures of banana and plantain. In *International Symposium on*

- Nuclear Techniques and in vitro Culture for Plant Improvement. Proceedings. Viena, IAEA-FAO. p. 167-174.
23. SIMMONDS, N.W. 1966. Los plátanos. 2 ed. Barcelona, Blume. 539 p.
24. VESSEY, J.C.; RIVERA J.S. 1981. Meristem culture of bananas. Turrialba (C.R.) 31(2):162-163.
25. VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. 1985. Feasibility of in vitro propagation of bananas and plantains. Tropical Agriculture 62(4):323-328.
26. WONG, W.C. 1986. In vitro propagation of banana (*Musa* spp.): Initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6:159-166.

LIBRO RECOMENDADO



Prospectiva de las Agrobiotecnologías. No. 34. Rodolfo Quintero. Programa II. 164 p. Serie Documentos de Programas (ISSN 1011-7741).

Consciente de la importancia de la biotecnología, el IICA ha desarrollado una serie de actividades de apoyo a los países miembros, tendientes a la formulación de políticas apropiadas para la difusión y la generación de agrobiotecnologías. En este contexto se ubica esta publicación, producto de una consultoría realizada por el Dr. Rodolfo Quintero, con el apoyo de ACIDI.

US\$5.00

Ver lista de publicaciones disponibles para la venta y boleta de solicitud en la última sección de la revista Turrialba.