

REGENERACIÓN *IN VITRO* DEL PLÁTANO CV. ‘HARTÓN GIGANTE’ (*MUSA AAB*)

SUNSHINE FLORIO, LUIS DE REAL Y NORCA MOGOLLÓN

Posgrado de Horticultura. Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Cabudare, Edo. Lara.

Correo electrónico: sunshineflorio@cantv.net, sunshineflorio@gmail.com

Resumen. El presente trabajo tuvo como objetivo la regeneración *in vitro* del plátano ‘Hartón Gigante’ (*Musa AAB*), frutal de importancia económica y básico en la dieta de la población en Venezuela. La micropropagación se llevó a cabo en tres fases: iniciación, multiplicación y enraizamiento de los brotes. En la fase de iniciación se cultivaron ápices caulinares de 5 y 8 mm de longitud en medios de cultivo en estado líquido con soporte Puente Heller (M1) y en estado sólido (M2). Estos medios estuvieron constituidos por las sales minerales de Murashige y Skoog (MS). El medio M1 fue suplementado con 0,125 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y 2 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP) y el medio M2 sólo con 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Los ápices de 5 mm cultivados en el medio M2 obtuvieron el mejor desarrollo (100 % de sobrevivencia, 5,58 cm de longitud promedio de brotes y 0 % de contaminación). En la multiplicación se probaron dos citocininas: BAP e Isopenteniladenina (2ip) en concentraciones de 2,5; 5,0 y 10,0 mg L⁻¹ y dos estados físicos del medio (líquido y sólido). La utilización de BAP en dosis de 5 y 10 mg L⁻¹ adicionada al medio líquido permitió incrementar el número de brotes por frasco; mientras que adicionada al medio sólido permitió el mayor crecimiento de los mismos. En la fase de enraizamiento se usó el medio MS sólido, con y sin la aplicación de carbón activado (2 g L⁻¹). El mayor número de hojas y raíces y la mayor longitud de raíces se obtuvo con la aplicación de este producto. *Recibido: 14 Abril 2009, aceptado: 29 Noviembre 2010.*

Palabras clave. Micropropagación, *in vitro*, plátano ‘Hartón Gigante’, *Musa AAB*.

***IN VITRO* REGENERATION OF PLANTAIN CV. ‘GIANT HARTON’ (*MUSA AAB*)**

Abstract. The objective of the present work was to study *in vitro* regeneration of ‘Giant Harton’ plantain (*Musa* AAB), a fruit tree of economic and basic importance in the human diet in Venezuela. Micropropagation was carried out in three phases: Initiation or establishment of the culture, multiplication, and rooting of shoots. In the initiation phase, caulinar apexes 5 and 8 mm long were cultivated in liquid culture medium with Heller bridge support (M1) and in solid medium (M2). The media consisted of Murashige and Skoog mineral salts (MS). The M1 medium was supplemented with 0.125 mg L⁻¹ of indolbutírico acid (IBA) and 2 mg L⁻¹ of bencilaminopurine (BAP), and M2 medium with 0.5 mg L⁻¹ of BAP. The 5 mm apexes cultivated in M2 medium had the best development (100 % survival, 5.58 cm mean shoot length and 0 % contamination). In the multiplication phase, two cytokinins were tested: BAP and Isopenteniladenine (2ip), in concentrations of 2.5, 5.0 and 10.0 mg L⁻¹, and two physical states of medium (liquid and solid). The use of BAP in doses of 5 and 10 mg L⁻¹ added to the liquid medium used to increase the number of shoots per bottle, while added to the solid medium allowed the highest growth of them. In the rooting phase the MS solid medium was used, with and without activated charcoal (2 g L⁻¹). The greatest number and maximum length of roots were obtained with application of this product. *Received: 14 April 2009, accepted: 29 November 2010.*

Key words. Micropropagation, *in vitro*, ‘Giant Hartón’ plantain, *Musa* AAB.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, el plátano ‘Hartón Gigante’ (*Musa* AAB) constituye un elemento básico en la dieta de la población y es uno de los renglones agrícolas más importantes por el valor de la producción, superficie sembrada, número y características socioeconómicas de las familias involucradas en el cultivo y mercado nacional de la fruta fresca y procesada (Martínez *et al.* 2004). En el ámbito nacional, ocupa el primer lugar en volumen de producción con 496.478 TM, lo cual representa un 44 % de la producción total de las frutas (FAOSTAT 2009).

Al igual que otros clones del género *Musa*, el plátano es triploide estéril partenocárpico y sólo es posible la reproducción y perpetuación de la especie a través de la propagación vegetativa o asexual (Khalil *et al.* 2002). Las “semillas” utilizadas para la siembra corresponden a partes vegetativas como

retoños, rizomas o hijos con tamaños y edades variables, lo que se traduce en marcadas diferencias en la época de maduración y cosecha (Bournnell 2003, Santos *et al.* 2005).

Las enfermedades en las musáceas comestibles ocasionan pérdidas en las cosechas, ya que reducen el área foliar, la masa fresca y la calidad de los racimos (Martínez *et al.* 1999). Por lo tanto, se hace necesaria la búsqueda de una serie de técnicas biotecnológicas como la micropropagación o regeneración *in vitro*, que ha permitido la producción masiva de plantas sanas, libres de organismos fitopatógenos, la multiplicación rápida de genotipos importantes, la uniformidad de las plantaciones y la obtención de variantes somaclonales resistentes a las enfermedades foliares, lo cual constituye herramientas para el mejoramiento genético (Roux *et al.* 2002).

En el presente trabajo se desarrolló un protocolo de micropropagación o regeneración *in vitro* del plátano ‘Hartón Gigante’ (*Musa* AAB), como estrategia para la obtención masiva de plantas uniformes, vigorosas, libres de organismos patógenos y que puedan estar disponibles en cualquier época del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

La micropropagación se realizó en el Laboratorio de cultivo *in vitro* de la Unidad de Biotecnología del Decanato de Agronomía, núcleo “Héctor Ochoa Zuleta” de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, en Cabudare, Municipio autónomo Palavecino del Estado Lara. La misma se llevó a cabo en tres fases, las cuales se detallan a continuación:

1.- Fase de iniciación: El objetivo de esta fase fue obtener material *in vitro* completamente libre de contaminación a partir de una previa selección de las yemas de aproximadamente 5 cm de longitud, del plantel inicial. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

- a) *Desinfección del material de laboratorio:* Todo el instrumental se lavó previamente con agua y jabón y luego se esterilizó en autoclave a 15 PSI de presión y 121°C durante 30 min.
- b) *Desinfección del material vegetal:* Las yemas fueron sometidas a una serie de pasos consecutivos de desinfección que incluyeron lavados con: 1) jabón iodado antiséptico (Iosep®) al 3 % durante 10 min en agitación constante; 2) solución de fungicida Benlate®

(4 g/L⁻¹) con adherente Tween 20[®] (30 gotas por litro) durante 10 min; 3) solución de bactericida y fungicida Kasumín[®] (4 ml/L⁻¹) con Tween 20[®] (30 gotas por litro) por 15 min y 4) hipoclorito de sodio (5,25 i.a) al 10 % durante 20 min. Después de cada paso mencionado, se realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada.

- c) *Preparación y cultivo del explante:* Los explantes utilizados para el establecimiento de los cultivos estuvieron constituidos por ápices caulinares de 5 y 8 mm de longitud, extraídos a partir de las yemas previamente desinfectadas y tratadas con cisteína estéril (60 mg L⁻¹) como antioxidante por 10 minutos. Dicha extracción se realizó bajo condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar y con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Para ello, con ayuda de pinzas y bisturí estériles, se eliminaron las hojas más externas hasta descubrir el ápice caulinar. Se colocó un explante por tubo de ensayo contentivo del medio de cultivo previamente esterilizado.
- d) *Medio de cultivo:* Los explantes se cultivaron en medios sólidos (Trujillo 1994) y líquidos (Orellana 1994), ambos constituidos por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962). La composición de estos medios se muestra en la Tabla 1.

Ambos medios de cultivo (sólido y líquido) se distribuyeron en tubos de ensayo (alícuotas de 20 ml) de 250 mm de largo x 15 mm de diámetro. A cada tubo con medio líquido, se le colocó internamente un soporte de papel de filtro para el explante (Puente Heller). Posteriormente, los tubos se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 15 PSI de presión y 121°C.

- e) *Condiciones de cultivo:* Los explantes se colocaron durante 48 h en oscuridad, con el objeto de disminuir la oxidación. Luego, se llevaron al cuarto de crecimiento con luz blanca fluorescente a una intensidad lumínica de 40,54 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de 25 \pm 2 °C y un fotoperíodo de 16 h luz, por un período de seis semanas hasta lograr la regeneración de los brotes.
- f) *Diseño estadístico:* Para evaluar el efecto de los tratamientos se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 x 2 (2 tipos de medios y 2 tamaños de explantes) para un total de

4 tratamientos, 25 repeticiones por tratamiento; siendo la unidad experimental un explante por tubo. Las variables evaluadas a los 45 días de cultivo fueron: porcentaje de sobrevivencia, porcentaje de oxidación, porcentaje de contaminación y longitud de brote. Los datos fueron procesados estadísticamente mediante el programa SAS versión 8.1 para Windows, realizando el análisis de la varianza correspondiente al diseño empleado.

Las variables porcentaje de sobrevivencia, oxidación y contaminación, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis, después de verificar que no se cumplían con los parámetros de normalidad, aún realizando las transformaciones correspondientes: Raíz cuadrada de X, Arcsen de la Raíz Cuadrada de X, Arcsen de X y Seno de la Raíz Cuadrada de X. El análisis de normalidad se realizó a través de la prueba de Wilk-Shapiro. En el caso de la variable longitud del brote, se realizó la separación de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan a un nivel de significancia del 0,1; 1 y 5 %.

2.- *Fase de multiplicación:* Considerando que la adición de citocininas en los medios de cultivo durante la etapa de multiplicación promueve el número de propágulos o plantas a obtener (Orellana 1994, Roels *et al.* 2005), este experimento estuvo dirigido a determinar el tipo de citocinina y la concentración más adecuada para maximizar la tasa de multiplicación, utilizando medios de cultivo sólido y líquido.

El explante utilizado estuvo constituido por brotes de 3,0 cm de longitud provenientes de la fase de iniciación; los cuales se implantaron en frascos de 180 ml de capacidad (10 cm de altura x 6 cm de diámetro), contentivos cada uno de 20 ml de medio de cultivo, previamente esterilizados en autoclave a 121 °C de temperatura y 15 PSI de presión durante 20 min.

Al respecto, se probaron dos citocininas: Bencilaminopurina (BAP) e Isopenteniladenina (2ip), en concentraciones de 2,5; 5,0 y 10,0 mg L⁻¹ y dos estados físicos del medio (líquido y sólido). Los otros componentes del medio se mantuvieron igual a los de la fase de iniciación, con la excepción de que en este caso no se agregó AIB y en el medio líquido no se usó el puente Heller como soporte para el explante, sino que éstos quedaron sumergidos y se colocaron en un agitador orbital a 100 RPM. Todos los explantes se incubaron en el cuarto de crecimiento a una intensidad lumínica de 67,57 μmol.m⁻².s⁻¹, temperatura de 25 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 h luz, por un período de seis semanas.

El diseño estadístico empleado en este experimento fue completamente al azar, bajo un arreglo factorial $2 \times 2 \times 3$ (2 estados físicos del medio, 2 citocininas y 3 concentraciones de cada una de las citocininas) con dos testigos únicos por citocinina, para un total de 14 tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento y un explante por frasco como unidad experimental.

Las variables evaluadas a los 45 días de cultivo fueron: número de brotes obtenidos por explante, longitud de los mismos y longitud máxima de raíces. Los datos fueron procesados estadísticamente mediante el programa SAS versión 8.1 para Windows, realizando el análisis de la varianza correspondiente al diseño empleado. La separación de medias se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan a un nivel de significancia del 1 y 5 %.

3.- Fase de enraizamiento: Considerando que los brotes obtenidos en la fase de multiplicación (medio líquido) no produjeron raíces, se sugirió una fase de enraizamiento para inducir la rizogénesis. Para ello, se usó el medio MS constituido por la formulación descrita en la fase de iniciación, exceptuando el uso de reguladores de crecimiento.

El estado físico del medio fue sólido adicionando agar (8 g L^{-1}), con y sin la aplicación de carbón activado (2 g L^{-1}). El mismo fue dispensado en frascos de 180 ml de capacidad, colocando 20 ml por frasco. Los frascos fueron colocados en condiciones de alta luminosidad ($135,14 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 16 h luz, durante cuatro semanas y así precondicionar la vitroplanta antes de su transferencia *ex vitro*.

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 2 tratamientos (con y sin carbón activado), 50 repeticiones por tratamiento, siendo la unidad experimental dos explantes por frasco.

Las variables evaluadas a los 30 días fueron: número de hojas, porcentaje de brotes enraizados, número y longitud máxima de raíces. Los datos fueron procesados estadísticamente mediante el programa SAS versión 8.1 para Windows.

La variable porcentaje de brotes enraizados se analizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis. En el caso de las variables número de hojas, número y longitud máxima de raíces, la separación de medias se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan a un nivel de significancia del 1 y 5 %.

Tabla 1. Medios de cultivo para la iniciación del plátano cv. ‘Hartón Gigante’ (*Musa* AAB) a partir de ápices caulinares.

Componentes	M1	M2
Sacarosa	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
Tiamina - HCl	30 mg L ⁻¹	30 mg L ⁻¹
Glicina	2 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹
Ácido nicotínico	5 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹
Piridoxina - HCl	1 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹
Mio-inositol	100 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
Cisteína (Antioxidante)	60 g L ⁻¹	60 g L ⁻¹
AIB	0,125 mg L ⁻¹	0
BAP	2 mg L ⁻¹	0,5 mg L ⁻¹
Agar (Bacto Agar [®])	0	8 g L ⁻¹
Carbón activado (antioxidante)	0	2 g L ⁻¹
pH	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1

M1: Medio líquido recomendado por Orellana (1994), M2: Medio sólido recomendado por Trujillo (1994). AIB: Ácido Indolbutírico (auxina). BAP: Bencilaminopurina (citocinina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Iniciación: Para el efecto de la combinación de dos medios de cultivo: M1 (líquido con soporte puente Heller) y M2 (sólido) y dos tamaños de ápices caulinares: 5 mm y 8 mm en el establecimiento del cultivo de plátano ‘Hartón Gigante’ (*Musa* AAB) a los 45 días, se detectaron diferencias altamente significativas en las variables porcentaje de sobrevivencia y longitud del brote, observándose mejores resultados con el cultivo de ápices caulinares de 5 mm en medio M2, donde se obtiene una sobrevivencia del 100 % y una longitud promedio del brote de 5,58 cm. Por el contrario, empleando el medio M1 y ápice de 8 mm, se registraron los menores valores de sobrevivencia (88 %) y longitud de brote (2,04 cm) (Tabla 2).

Estos resultados superaron a los señalados por Trujillo (1994), quien utilizó el medio de cultivo M2 y ápices de banano ‘Brasilero’ de 5 mm y obtuvo un 70 % de sobrevivencia y una longitud promedio de 3,5 cm. Igualmente, coinciden con los reportados por otros autores, donde la utilización de ápices caulinares de 5 mm, produjo un mayor porcentaje de sobrevivencia de los explantes (Roels *et al.* 2005, Colmenares y Giménez 2007).

Adicionalmente, los resultados obtenidos en esta fase superan notablemente a los reportados en plátano ‘Curraré’ (Barrantes y Acuña 1995) y banano ‘Gran Enano’ (González *et al.* 2002), donde la bencilaminopurina a una

dosis de 0,5 mg L⁻¹ fue efectiva para estimular el mayor porcentaje de sobrevivencia y longitud de brotes.

Tabla 2. Efecto de la combinación de los medios de cultivo: líquido con soporte Puente Heller (M1) y sólido (M2) y dos tamaños de ápices caulinares: 5 mm y 8 mm sobre la iniciación del plátano ‘Hartón Gigante’ (*Musa AAB*) a los 45 días de cultivo.

Tamaño del ápice (mm)	Medio de cultivo	Sobrevivencia (%) ^a	Longitud promedio del brote (cm) ^b	Oxidación (%) ^a	Contaminación (%) ^a
5	M1	92 c ^z	2,97 c ^z	0	8 b ^z
	M2	100 a	5,58 a	0	0 a
8	M1	88 d	2,04 d	0	12 c
	M2	96 b	3,82 b	0	4 b
C. V (%)		11,23	13,55	10,85	11,93
P		***	***	ns	**

^z Valores con la misma letra no difieren estadísticamente al nivel del 5 %, según: ^aPrueba no paramétrica de Kruskal y Wallis y ^bPruebas de Rangos Múltiple de Duncan (n=25). ns: no significativo; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Los valores promedios de porcentaje de sobrevivencia obtenidos en este trabajo se corresponden con los reportados por Barrantes y Acuña (1995), quienes estudiaron la influencia de la consistencia del medio de cultivo en la micropropagación del plátano ‘Curraré’ (AAB), obteniéndose el 90 % de sobrevivencia de los explantes con el estado físico sólido.

En cuanto a la variable porcentaje de oxidación, no hubo necrosamiento u oscurecimiento de los tejidos en ninguno de los medios de cultivo ni tamaños de ápices caulinares evaluados (Tabla 2). Esto posiblemente fue debido a la adecuada manipulación de los explantes, condiciones de oscuridad por 48 h y tratamiento antioxidante con carbón activado y cisteína, adicionado al medio de cultivo (M2) y la utilización previa de ésta en el momento de la transferencia de los ápices a cada uno de los medios. Esto concuerda con los estudios realizados por Thorpe *et al.* (1991), quienes señalaron que el carbón activado se usa para adsorber compuestos tóxicos de la microatmósfera gaseosa y el exceso de reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo. Del mismo modo, Utino *et al.* (2001) señalaron que la oxidación fenólica de los tejidos en el cultivo *in vitro*, se logra reducir con el uso de antioxidantes en el medio nutritivo.

Para la variable porcentaje de contaminación, se detectaron diferencias significativas, resultando superior el medio de cultivo M2 y ápice caulinar de 5 mm, donde no hubo contaminación (Tabla 2). Los resultados de porcentaje de contaminación superan a los señalados por Orellana (1994) quien trabajando con ápices caulinares de banano ‘Gran Enano’ de 5 y 8 mm de longitud y desinfectados sólo con hipoclorito de sodio al 3 %, obtuvo elevados porcentajes de contaminación de los explantes (25 y 35 %, respectivamente). Igualmente, superan a los reportados por Van den Houwe *et al.* (1998), quienes al aplicar un protocolo de desinfección basado en etanol al 70 % e hipoclorito de sodio al 2 %, obtuvieron 20 y 30 % de contaminación bacteriana en los ápices de 5 mm y 50 % en los de 10 mm en cultivares de banano ‘Gran Enano’ y ‘Pisang Palembang’, respectivamente.

Se ha señalado la influencia del tamaño del explante inicial en la incidencia de contaminación y se ha comprobado que en la medida que el tejido es más pequeño y más cercano al meristema apical, las poblaciones de microorganismos, disminuyen (García *et al.* 2002).

Los resultados obtenidos indican que a mayor longitud del ápice caulinar (8 mm) en medios de cultivo líquido con soporte Puente Heller, el porcentaje de contaminación se incrementó. Esto se corresponde con lo establecido por algunos autores (Strosse *et al.* 2004, Pérez *et al.* 2006, Colmenares y Jiménez 2007), quienes señalaron que la longitud óptima de los ápices caulinares para el cultivo *in vitro* de bananos (AAA) y plátanos (AAB) debe encontrarse en un rango de 3 a 5 mm y cuando se cultivan en medios sólidos, principalmente para evitar el incremento de la contaminación por organismos patógenos.

2.- *Multiplificación:* El efecto de dos citocininas (BAP y 2ip) y dos estados físicos del medio de cultivo (M1 sin soporte y M2) sobre la multiplicación de plátano ‘Hartón Gigante’ (*Musa* AAB) a los 45 días del cultivo, se muestra en la Tabla 3. El análisis de la varianza detectó diferencias altamente significativas para tratamientos en las tres variables evaluadas.

En relación al número de brotes por explante, los mayores valores se alcanzaron en medio líquido en presencia de BAP, independientemente de la concentración usada. Igualmente, al usar 2ip en el medio líquido no hubo diferencias estadísticas entre las concentraciones usadas, registrándose valores que variaron de 5,28 a 5,98 brotes por explante. Sin embargo, en el medio sólido todos los tratamientos, incluyendo el testigo, se comportaron estadísticamente iguales e inferiores al resto de los tratamientos.

Tabla 3. Efecto de dos citocininas: Bencilaminopurina (BAP) e Isopenteniladenina (2ip) y dos estados físicos del medio de cultivo: líquido y sólido sobre el desarrollo de los brotes de plátano ‘Hartón Gigante’ (*Musa AAB*) a los 45 días de cultivo en fase de multiplicación.

Tratamientos		Concentración (mg L ⁻¹)	Número de brotes/explante	Longitud de brote (cm)	Longitud máxima de raíces (cm)
Líquido (sumergido)	Testigo	0	3,18 c ^z	1,32 d ^z	0 c ^z
		2,5	6,50 a	4,34 b	0 c
	BAP	5,0	8,93 a	4,10 b	0 c
		10,0	7,97 a	3,48 c	0 c
		2,5	5,28 b	3,34 c	0 c
		5,0	5,43 b	3,27 c	0 c
	2ip	10,0	5,98 b	3,16 c	0 c
		Testigo	0	1,46 d	1,85 d
	Sólido (agar)		2,5	1,51 d	5,76 a
		BAP	5,0	1,56 d	5,95 a
10,0			1,62 d	5,24 a	3,90 a
2ip		2,5	1,25 d	4,21 b	3,18 b
		5,0	1,28 d	4,11 b	3,14 b
10,0		1,39 d	4,08 b	3,11 b	
C. V. (%)			12,36	11,29	11,35
P			***	***	***

^z Valores con la misma letra no difieren estadísticamente al nivel del 5 %, según las Pruebas de Rangos Múltiple de Duncan (n=10). *** P < 0,00.

Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Hardy y García (1994), donde la dosis de 5 mg L⁻¹ de BAP adicionado al medio MS sólido, fue la mejor concentración para la inducción del mayor número de brotes en banano ‘Cavendish’ (AAA).

El número de brotes por explante difieren de los obtenidos por Arinaitwe *et al.* (2000), quienes establecieron una tasa promedio de 10,2 brotes por explante en el cultivar ‘Ndiziwemiti’; 9,5 en el cultivar ‘Kibuzi’ y 8,2 en el cultivar ‘Bwara’, con una dosis de 5 mg L⁻¹ de BAP en medio líquido en constante agitación. Se presume que la diferencia en estos resultados puede atribuirse a las características propias de cada genotipo.

En cuanto a la longitud de brote (Tabla 3), los mayores valores se obtuvieron en el medio sólido suplementado con BAP, independientemente de la concentración usada, registrándose valores promedios que oscilaron entre 5,24 y 5,95 cm. Al usar BAP (10,0 mg L⁻¹) y cualquiera de las concentraciones de 2ip en el medio líquido, se registraron valores estadísticamente inferiores al resto de los tratamientos con hormonas (3,16 a 3,48 cm). Se observó que la mayor longitud total de los brotes se presentó en los tratamientos testigos, lo

que evidencia la necesidad de agregar citocinina al medio de cultivo para obtener una adecuada longitud de brote, tal como ha sido señalado por Lisei *et al.* (2002).

Estos resultados destacan el efecto positivo de las citocininas en promover el crecimiento de los brotes de plátano, siendo mayor cuando se usa BAP en medio sólido. Las respuestas se asemejan con lo reportado en bananos (AAA) y topochos (ABB), donde BAP fue la citocinina más efectiva en la inducción y proliferación de los brotes (Arinaitwe *et al.* 2000, Jambhale *et al.* 2001, Muhammad *et al.* 2006, Colmenares y Giménez 2007).

Con respecto a la variable longitud máxima de raíces se encontraron diferencias altamente significativas. En este experimento, sólo se observó rizogénesis en los tratamientos en medio sólido, registrándose valores que variaron entre 3,11 a 4,06 cm (Tabla 3). En este sentido, los resultados coinciden con los reportados por otros autores (Dhumale *et al.* 1997, Oliveira y Silva 1997), donde la mayoría de las plantas del género *Musa* presentan un notable incremento en la longitud de raíces sólo en los medios de cultivo sólidos.

En todos los tratamientos con hormonas en M2 se observó una relación inversa entre la longitud máxima de raíces y la concentración de citocinina. También se observó una tendencia al incremento del número de brotes por explante y a la disminución de la longitud de los mismos, con el aumento en la concentración de BAP y 2ip (Tabla 3), lo cual puede deberse al acortamiento de entrenudos común en altas concentraciones de dichas sustancias, de acuerdo a lo sugerido por Salisbury y Ross (1994). Esto se corresponde con Capellades *et al.* (1991), quienes señalaron que incrementos en los niveles de citocininas puede mejorar la tasa de multiplicación pero al mismo tiempo afectar el tamaño y calidad del brote.

En esta investigación, los resultados obtenidos sugieren la elección del medio de cultivo líquido para el establecimiento de un protocolo más sencillo, eficiente y rentable en la fase de multiplicación; ya que la exclusión del agar o cualquier otro agente gelificante puede disminuir hasta un 60 % los costos de preparación de medios y abre la posibilidad de la automatización de la micropropagación, tal como ha sido señalado Etienne y Berthouly (2002).

3.- *Enraizamiento*: Después de 30 días de cultivo en el medio MS en estado sólido (agar) con y sin la aplicación de carbón activado (2 g L^{-1}), el análisis detectó diferencias altamente significativas para las variables número de hojas,

número de raíces y longitud máxima de las mismas en los brotes de plátano cv. 'Hartón Gigante' (*Musa* AAB) provenientes de la fase de multiplicación en medio líquido (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del medio MS en estado sólido (agar) con y sin la aplicación de carbón activado (2 g L^{-1}) sobre el porcentaje de brotes enraizados, número de hojas, número y longitud máxima de raíces de los brotes de plátano 'Hartón Gigante' (*Musa* AAB) durante 30 días de cultivo en la fase de enraizamiento.

Tratamientos	Carbón activado (g L^{-1})	% de brotes enraizados ^a	Número de hojas ^b	Número de raíces ^b	Longitud máxima de raíces (cm) ^b
Medio sólido	0	100	4,32 b ^z	7,64 b ^z	7,31 b ^z
(agar)	2,0	100	5,03 a	9,48 a	10,65 a
C. V. (%)		12,02	11,42	11,96	10,74
P		ns	***	***	***

^zValores con la misma letra no difieren estadísticamente al nivel del 5 %, según: ^aPrueba no paramétrica de Kruskal y Wallis y ^bPruebas de Rangos Múltiple de Duncan (n=50). ns: no significativo; *** P<0,001.

Los mayores valores de las variables número de hojas, número de raíces y longitud máxima de las mismas, se alcanzaron en el medio de cultivo con la aplicación de carbón activado (5,03; 9,48 y 10,65 cm, respectivamente). En relación al porcentaje de brotes enraizados, no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos, obteniéndose 100 %. Resultados similares fueron reportados por otros autores (Oliveira y Silva, 1997; Gubbuck y Pekmezci, 2006), quienes establecieron que los clones de *Musa* enraízan simplemente en un medio de cultivo MS sólido básico y con la adición de carbón activado. Igualmente, coinciden con Choi (1991) quien logró 100 % de enraizamiento de vitroplantas de jengibre (*Zingiber officinale*) en el medio MS sólido sólo con la aplicación de 2 g L^{-1} de carbón activado. Sin embargo, difieren de los señalados por Castro *et al.* (2002), quienes lograron el mayor porcentaje de enraizamiento de banano 'Giant Cavendish' en medios de cultivos sólidos suplementados con auxinas.

En este experimento, las respuestas obtenidas en relación a las variables porcentaje de brotes enraizados, número y longitud de raíces, difieren de lo reportado en bananos 'Anamur 2', 'Dwarf Cavendish' y 'Gazipasa 6', donde todos los cultivares presentaron un promedio del 75 % de brotes con rizogénesis, 6 raíces y una longitud de 10 cm (Gubbuck y Pekmezci 2006). Así mismo, superan a los resultados obtenidos por Braga *et al.* (2001) quienes

señalaron en banano ‘Caipira’ un 65 % de brotes enraizados y raíces de 2 cm de longitud.

El desarrollo de las raíces en el medio de cultivo MS sólido, sin la aplicación de ningún tipo de regulador de crecimiento, sugiere que esta planta posee contenido endógeno de auxina suficiente para el proceso de rizogénesis. Igualmente, se evidencia que aunque la presencia del carbón activado no es indispensable para el proceso de enraizamiento, la adición de este en dosis de 2 g L⁻¹ induce un mayor número y longitud de raíces y número de hojas. Estas respuestas se asemejan a los resultados indicados por Pan y Van Staden (1998), quienes señalaron que este producto se utiliza *in vitro* para adsorber inhibidores en estado sólido y gaseoso, compuestos fenólicos y establece condiciones de oscuridad en el medio de cultivo.

CONCLUSIONES

La micropropagación del plátano ‘Hartón Gigante’ requirió de la ejecución de las fases de iniciación o establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*. Durante la fase de iniciación del plátano, el mejor desarrollo de los ápices se obtuvo mediante el cultivo de ápices caulinares de 5 mm de longitud en el medio de Murashige y Skoog (MS) en estado sólido y suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP).

En la fase de multiplicación, la utilización de BAP en dosis de 5 y 10 mg L⁻¹ adicionada al medio líquido permitió incrementar el número de brotes por frasco; mientras que adicionada al medio sólido permitió el mayor crecimiento de los mismos. El enraizamiento de las vitroplantas se logró en el medio de cultivo MS sólido sin la adición de reguladores de crecimiento. La rizogénesis se vio favorecida por la aplicación del antioxidante carbón activado en dosis de 2 g L⁻¹.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio de cultivo *in vitro* de la Unidad de Biotecnología del Decanato de Agronomía, núcleo “Héctor Ochoa Zuleta” de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado.

LITERATURA CITADA

- ARINAITWE G., P. RUBAIHAYO Y M. MAGAMBO. 2000. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. *Scientia Horticulturae* (NLD) 86: 13 – 21.
- BARRANTES W. Y P. ACUÑA. 1995. Influencia de la consistencia del medio de cultivo y de la concentración de 6-Bencilaminopurina en la micropropagación del plátano. *Memorias de la XI Reunión de la Asociación para la Cooperación en Investigación de Banano en el Caribe y en América Tropical (ACORBAT)*. pp: 191 – 209.
- BOURSNELL C. 2003. El poder de los genes alimenta una revolución agrícola en África. Informe Anual. International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP). Montpellier, Francia. p. 14 – 19.
- BRAGA M., M. LISEI DE SÁ Y P. MUSTAFÁ. 2001. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa* sp.) cv. 'Caipira' (AAA). *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal* 23(2): 215 – 219.
- CAPELLADES M., R. LEMEUR Y P. DEBERGH. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 21 – 26.
- CASTRO D., J. DÍAZ Y N. MONTROYA. 2002. Propagación clonal de banano en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Memorias de la XV Reunión Internacional ACORBAT*. Cartagena de Indias, Colombia. p. 44 – 48.
- CHOI S. 1991. Studies on the clonal multiplication of ginger through the *in vitro* cuttings. *The Research Reports of the Rural Development Administration Vol. 33-1 (Biotechnology)*. Kwangju Korea Republic: 33 - 39.
- COLMENARES M. Y A. GIMÉNEZ. 2007. Inducción de yemas múltiples en *Musa* plátano 'Hartón Gigante' con Inmersión Temporal. *Ciencia* 15(3): 331 – 340.
- DHUMALE D., A. KADU, S. GHOLAR Y G. INGOLE. 1997. *In vitro* multiplication of banana var. 'Shrimanti' from the shoot tip explants. *Annals of Plant Physiology* 11(2): 214 – 218.
- ETIENNE H. Y M. BERTHOULY. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 215 - 231.
- FAOSTAT. 2009. Base de datos estadísticos FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>.
- GARCÍA L., B. PÉREZ, Z. SARRÍA Y J. CLAVERO. 2002. Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIA-20. *InfoMusa* 11(1): 35 – 38.
- GONZÁLEZ L., T. RAMÍREZ, J. VENTURA, R. LANDA, D. REINALDO Y E. OTERO. 2002. Efecto de diferentes auxinas de crecimiento en la micropropagación *in vitro* de *Musa* spp. *Centro Agrícola* 29(2): 15 – 17.
- GUBBUK H. Y M. PEKMEZCI. 2006. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.) using thidiazuron and activated charcoal. *Acta Agriculturae Scandinavica* 56(1): 65 - 69.

- HARDY I. Y E. DE GARCÍA. 1994. Micropropagación de banano (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. *PHYTON* 1: 31- 41.
- JAMBHALE N., S. PATIL, A. JADHAV, S. PAWAR Y B. WAGHMODE. 2001. Effect of number of subcultures on *in vitro* multiplication of four banana clones. *InfoMusa* 10(1): 38 - 39.
- KHALIL S., K. CHEAH, E. PÉREZ, D. GASKILL Y J. HU. 2002. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 20: 1128 – 1134.
- LISEI DE SÁ M. Y M. BRAGA. 2002. Avaliação de protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata-Anã (Subgrupo AAB). *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal* 24(1): 236 – 239.
- MARTÍNEZ G., E. MANZANILLA Y R. PARGAS. 1999. Modelo de un sistema de propagación y producción simultánea (SPPS) en musáceas. *Fonaiap Divulga* 64. Octubre – Diciembre. pp: 2 – 6.
- MARTÍNEZ G., O. TREMONT Y J. HERNÁNDEZ. 2004. Manual técnico para la propagación de Musáceas. *Revista Digital Ceniap Hoy* 4. Enero – Abril. Maracay, Venezuela.
URL:www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n4/texto/gmartinez.htm (visitado el 28/12/2008).
- MUHAMMAD A., H. RASHID, I. HUSSAIN Y S. SAQLAN. 2006. Comparison of BAP and Kinetin on proliferation rate of banana (*Musa* spp.) cv. ‘Basrai’. *Memorias de la XVII Reunión ACORBAT*. Santa Catarina, Brasil. pp: 494 - 497.
- MURASHIGE T. Y F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth on bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497.
- OLIVEIRA R. Y S. SILVA. 1997. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32(4): 415 - 420.
- ORELLANA P. 1994. Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Resumen de Tesis Doctoral. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. 25 p.
- PAN M. Y J. VAN STADEN. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture. A review. *Plant Growth Regulation*. 26: 155- 163.
- PÉREZ M., V. VÁSQUEZ Y J. OSUNA. 2006. Efecto del Plant Preservative Mixture (PPM) y bencilaminopurina en la propagación *in vitro* de plátano ‘Macho’ (*Musa* AAB). *Memorias de la XVII Reunión ACORBAT*. Santa Catarina, Brasil. pp: 504 - 509.
- ROELS S., M. ESCALONA, I. CEJAS, C. NOCEDA, R. RODRÍGUEZ, M. CANAL, J. SANDOVAL Y P. DEBERGH. 2005. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82(1): 57 – 66.
- ROUX N., A. TOLOZA, J. BUSOGORO, B. PANIS, H. STROSSE, P. LEPOIVRE, R. SWENNEN Y F. ZAPATA-ARIAS. 2002. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. *In: Jacome, L.; P.*

- Lepoivre.; D. Marin; R. Ortiz.; R. Romero and J. Escalant (EDS). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José, Costa Rica. 20 – 23 May 2002. pp: 239 – 250.
- SALISBURY F. Y C. ROSS. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D. F. p. 423 – 435.
- SANTOS C., N. MARTINS, H. HÖRBERG, E. ALMEIDA, M. COELHO, R. TOGAWA, F. DA SILVA, A. CAETANO, N. MILLER Y M. SOUZA. 2005. Analysis of expressed sequence tags from *Musa acuminata* ssp. *Burmannicoides* var. Calcutta 4 (AA) leaves submitted to temperature stresses. *Theor Appl Genet* 110: 1517 – 1522.
- STROSSE H., I. VAN DEN HOUWE Y B. PANIS. 2004. Banana cell and tissue culture-review. *In: Jain, S. y R. Swennen (Eds.)*. Cellular, molecular biology and induced mutations. Science Publishers Inc. Enfield, USA. 400 pp.
- THORPE T., I. HARRY Y P. KUMAR. 1991. Application of micropropagation to forestry. Micropropagation, technology and applications. *In: Debergh y Zimmermann (Eds.)*. Kluwer Academic Press. UK. pp: 311 - 316.
- TRUJILLO I. 1994. Aplicación de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético del género *Musa*. Trabajo de Grado. Doctorado en Botánica. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 258 pp.
- UTINO S., I. FERNÁNDEZ Y L. CHAVES. 2001. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira ‘Prata’ (*Musa* AAB) *in vitro*. IV Concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal – SP. 23(2): 409 – 412.