

# Inducción de yemas múltiples en *Musa* (AAB) Plátano "Hartón Gigante" con Inmersión Temporal

Maribel Colmenares Esqueda\* y Carlos Giménez Alvarado

Laboratorio de Biotecnología Vegetal (BioVeLUZ), Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 26-06-06 Aceptado: 30-05-07

## Resumen

La embriogénesis somática es el método de micropropagación más eficiente en plantas. En *Musa*, la producción de yemas múltiples, es una etapa crítica para el desarrollo de protocolos de embriogénesis somática. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de diferentes concentraciones de N6-benciladenina (BA) y diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, en la inducción de yemas múltiples en *Musa* (AAB) Plátano "Hartón Gigante". Se cultivaron ápices vegetativos en medio de cultivo MS, con las fitohormonas IAA 1  $\mu\text{M}$  y BA en diferentes concentraciones (10, 50 ó 100  $\mu\text{M}$ ) y dos sistemas de cultivo: envases de vidrio cerrados con medio sólido y medio líquido en recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA). Se evaluó la formación de yemas y brotes durante 5 ciclos consecutivos de cultivo. Los resultados muestran que durante el quinto ciclo se obtuvieron  $166,5 \pm 13,5$  yemas múltiples/explante en los sistemas RITA y 100  $\mu\text{M}$  de BA mientras que en medio sólido sólo se alcanzó  $36 \pm 5,7$  con la misma concentración de BA. El tratamiento más adecuado para la inducción de yemas múltiples en el menor tiempo, resultó ser el medio líquido suplementado con 100  $\mu\text{M}$  de BA en inmersión temporal.

**Palabras clave:** Inmersión temporal; *Musa* (AAB); N<sup>6</sup>-Benciladenina; Yemas múltiples.

## *Musa* (AAB) "False Horn" scalps induction by temporary immersion

### Abstract

Somatic embryogenesis is the most efficient methods for micropropagation in plants. In *Musa*, scalp production is a critical step to develop somatic embryogenesis protocols. The objective of this research was to evaluate the effect of N6-benciladenina (BA) concentration and different culture systems on scalps induction of *Musa* (AAB) "False Horn" Plantain. Shoot tips were cultured in MS medium supplemented with IAA 1  $\mu\text{M}$  and BA at different concentrations (10, 50, and 100  $\mu\text{M}$ ) with two cultured system: closed jar with solid media and automated recipients for temporary immersion (RITA). Shoot and scalps induction were evaluated during five consecutive cycles of culture. The results show that for the 5<sup>th</sup> cycle were obtained  $166.5 \pm 13.5$  scalps per explant for temporary immersion and 100  $\mu\text{M}$  BA while for solid media just reach to  $36 \pm 5.7$  scalps per explant at the same BA concentration. The most adequate treatment for scalp induction in the shortest time was the liquid media supplemented with 100  $\mu\text{M}$  BA at temporary immersion.

**Key words:** *Musa* (AAB); temporary immersion; N<sup>6</sup>-Benciladenine; scalps.

\* Autor para la correspondencia. E-mail: mcolmenares@luz.edu.ve

## Introducción

Los bananos son el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz (1). Además de ser considerado un producto básico y de exportación, constituyendo una importante fuente de alimento, empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo, siendo el principal cultivo de las regiones húmedas y cálidas del sudoeste asiático. Los países latinoamericanos y del Caribe producen la mayor parte de los plátanos y bananos que entran en el comercio internacional, unos 10 millones de toneladas, del total mundial de 12 millones de toneladas (1).

Dada su gran importancia económica y agroalimentaria y los graves problemas causados por enfermedades fungosas y virales, ha aumentado el interés sobre el mejoramiento en Musáceas comerciales. Sin embargo, los principales cultivares comerciales de *Musa* son triploides, estériles y con frutos partenocárpicos, por lo que los programas de mejoramiento convencional son de difícil aplicación (2). En respuesta a estos problemas, la biotecnología ofrece nuevas estrategias basadas en técnicas moleculares para aislar genes de resistencia y su inserción en el genoma de las variedades comerciales susceptibles como estrategia para obtener plantas resistentes y/o tolerantes a diferentes plagas (3).

Para lograr el desarrollo de estas aplicaciones biotecnológicas, se requiere de un protocolo de regeneración eficiente como la embriogénesis somática, la cual se ha vinculado ineludiblemente a cualquier sistema de transformación genética. Por tanto el dominio integral del sistema de embriogénesis somática sería de gran valor, no solamente para la micropropagación a escala industrial sino también para los programas de mejoramiento genético mediante transgénesis.

Para la inducción de la embriogénesis somática en *Musa* se han utilizado diferentes explantes: a) fragmentos del rizoma y bases foliares (4), b) flores masculinas y femeninas

inmaduras (5, 6), c) embriones cigóticos (7) y d) yemas múltiples (8-10). El uso de flores masculinas y femeninas inmaduras ha sido el más utilizado, sin embargo, la eficiencia de la inducción es menos del 1% para la mayoría de los cultivares (11). Por otra parte, este procedimiento es muy laborioso y requiere de un acceso directo al campo, debido a que se produce un rápido declive de la respuesta embriogénica luego de cosechadas las bellotas. Otra desventaja, es que algunos cultivares de plátanos comerciales carecen del brote masculino y por lo tanto de las flores masculinas inmaduras. Una alternativa para superar este problema, podría ser el uso de flores femeninas, sin embargo esta práctica resulta en la pérdida del racimo y de la planta completa, lo cual dificulta enormemente su aplicación en la investigación.

El cultivo de yemas múltiples en altas concentraciones (100  $\mu$ M) de N6-benciladina (BA) en medios sólidos, se ha logrado establecer en diferentes especies silvestres y cultivares. El tiempo que se requiere para su inducción es de 4 a 12 meses según el cultivar o la especie estudiada (12). Sin embargo, aun no se han establecido protocolos eficientes para la inducción de embriogénesis somática de la mayoría de los cultivares de *Musa* spp (13).

Hasta ahora, la inducción de yemas múltiples se ha realizado en medios sólidos y no se tienen reportes de la aplicación de la inmersión temporal para mejorar la inducción de este proceso. La inmersión temporal es un sistema de cultivo en medio líquido que ha demostrado aumentar las tasas de multiplicación en Musáceas (14, 15). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inmersión temporal y de diferentes concentraciones de BA en la inducción de yemas múltiples. Los resultados de esta investigación demuestran por primera vez, que la aplicación de la inmersión temporal en la inducción de yemas múltiples aumenta el índice de multiplicación en menor tiempo.

## Materiales y Métodos

### Material Vegetal

Se utilizaron cormos de *Musa* (AAB) Plátano "Hartón Gigante", colectados en la finca Ediliana del municipio Maracaibo, estado Zulia. Esta zona se caracteriza por un clima de bosque tropical seco y temperaturas promedios de 30°C con una humedad relativa del 80%.

### Establecimiento del Material Vegetal

Para la desinfección de los explantes y su iniciación en condiciones asépticas se siguió la metodología reportada por Vuylsteke (16) y modificada por Colmenares y Giménez (15). Los cormos se lavaron y se les extrajeron las hojas hasta llevarlos a un tamaño mínimo de 5 cm. Luego, estos cormos reducidos fueron desinfectados con una solu-

ción de hipoclorito de sodio (5 %) por 20 min, lavados 3 veces con agua estéril y sumergidos en una solución antioxidante (cisteína 60 mg/L y ácido ascórbico 10 mg/L) por 5 min. Luego fueron transferidos individualmente en cámara de flujo laminar, a frascos de cristal cerrados con medio líquido de iniciación (MI) estático (Tabla 1), manteniéndolos en oscuridad durante 5 días. Posteriormente se colocaron en luz continua a 50  $\mu$ moles/m<sup>2</sup>s durante 7 días adicionales y se observó la apariencia del medio de cultivo para evaluar la presencia de contaminación por hongos y/o bacterias. Luego de esta primera etapa de selección, se cortaron los cormos longitudinalmente y fueron transferidos nuevamente a medio MI para hacer una segunda selección durante 7 días adicionales y descartar todos los posibles explantes contaminados por hongos y/o bacterias.

Tabla 1  
Medio de iniciación (MI) y de multiplicación (MM) para microcormos de *Musa* (AAB) Plátano "Hartón gigante".

Componentes	MI	MM
Murashige y Skoog (24)	1X	1X
Cisteína	60 mg/L	
Ácido Ascórbico	100 mg/L	10,0 mg/L
Sacarosa	40 g/L	30,0 g/L
Agua de Coco	15 %	
Vitaminas	1X	
Morel y Wetmore (25)		
D-Biotina	0,01mg/L	
Ácido Pantoténico	1 mg/L	
Mio-inositol	100 mg/L	
Acido nicotínico	1 mg/L	0,5 mg/L
Piridoxina HCl	1 mg/L	0,5 mg/L
Tiamina HCl	1 mg/L	0,4 mg/L
N6-benciladenina (BA)		Según Tabla 2
Ácido indol 3-acético (AIA)		1,0 $\mu$ M
Glycina		2,0 mg/L
pH	5,8	5,8

### Inducción de Brotes y Yemas Múltiples

Luego de la fase de iniciación y el descarte de los explantes contaminados, todos los cormos reducidos y seccionados longitudinalmente fueron cultivados en medio de multiplicación de brotes con 2,5 mg/L de BA (Tabla 1) durante 15 días.

Seguidamente se procedió a la inducción de yemas múltiples en el medio de multiplicación (MM) variando la concentración de la citoquinina BA (10, 50 ó 100  $\mu\text{M}$ ) y dos sistemas de cultivo: a) envases de vidrio (500 mL) cerrados con papel aluminio conteniendo medio sólido y b) medio líquido en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA) resultando un diseño de 7 tratamientos (Tabla 2). T0: los 5 ciclos consecutivos con 10  $\mu\text{M}$  BA, RITA; T1: los 5 ciclos consecutivos con 100  $\mu\text{M}$  BA, RITA; T2: los 2 primeros ciclos con 100  $\mu\text{M}$  BA y los 3 ciclos siguientes con 50  $\mu\text{M}$  BA, RITA; T3: igual que T1 pero en medio sólido; T4: igual que T0 pero en medio sólido; T5: el primer ciclo con 10  $\mu\text{M}$  BA y los siguientes 4 ciclos con 100  $\mu\text{M}$  BA, RITA; T6: igual que T5 pero en medio sólido.

La muestra fue totalmente aleatoria, 4 explantes con 4 repeticiones, para un total de 16 explantes por tratamiento. El cultivo en RITA se realizó con una frecuencia de in-

mersión cada 4 h, durante 20 min. Todos los ensayos fueron cultivados con un fotoperíodo 12/12 h a 50  $\mu\text{moles}/\text{m}^2\text{s}$   $28\pm 2^\circ\text{C}$  y durante cinco ciclos de multiplicación (28 días por ciclo) sin seccionar el explante, solo la limpieza del tejido necrosado u oxidado y la eliminación de las hojas de los brotes alargados que se desarrollaron durante cada ciclo de cultivo.

En este trabajo se denominaron yemas múltiples a las estructuras compuestas por domos meristemáticos aplanados, globosos, de color blanquecino, con un tamaño máximo de 3 mm, que se desarrollaron en la superficie del explante y se catalogó como brotes a las yemas con primordios foliares desarrollados de por lo menos 4 mm (Figura 1 B y C).

### Evaluación de los Datos

Se evaluó el número de yemas múltiples y brotes formados por explante cada 28 días de cultivo (ciclo de multiplicación) durante cinco ciclos de multiplicación para cada uno de los tratamientos aplicados (Tabla 2). Para evaluar las diferencias entre los tratamientos se aplicó la prueba paramétrica "post hoc" de múltiples rangos de Duncan para un ANOVA de una vía, previa comprobación de los supuestos de homogeneidad

Tabla 2  
Diferentes tratamientos ensayados para la inducción de yemas múltiples en *Musa* (AAB)  
Plátano "Hartón gigante".

Tratamientos	Ciclos	[BA] $\mu\text{M}$	Sistema de cultivo
T0	5	10	RITA, medio líquido
T1	5	100	RITA, medio líquido
T2	2 3	100 50	RITA, medio líquido
T3	5	100	Cerrado, Medio sólido
T4	5	10	Cerrado, Medio sólido
T5	1 4	10 100	RITA, medio líquido
T6	1 4	10 100	Cerrado, Medio sólido

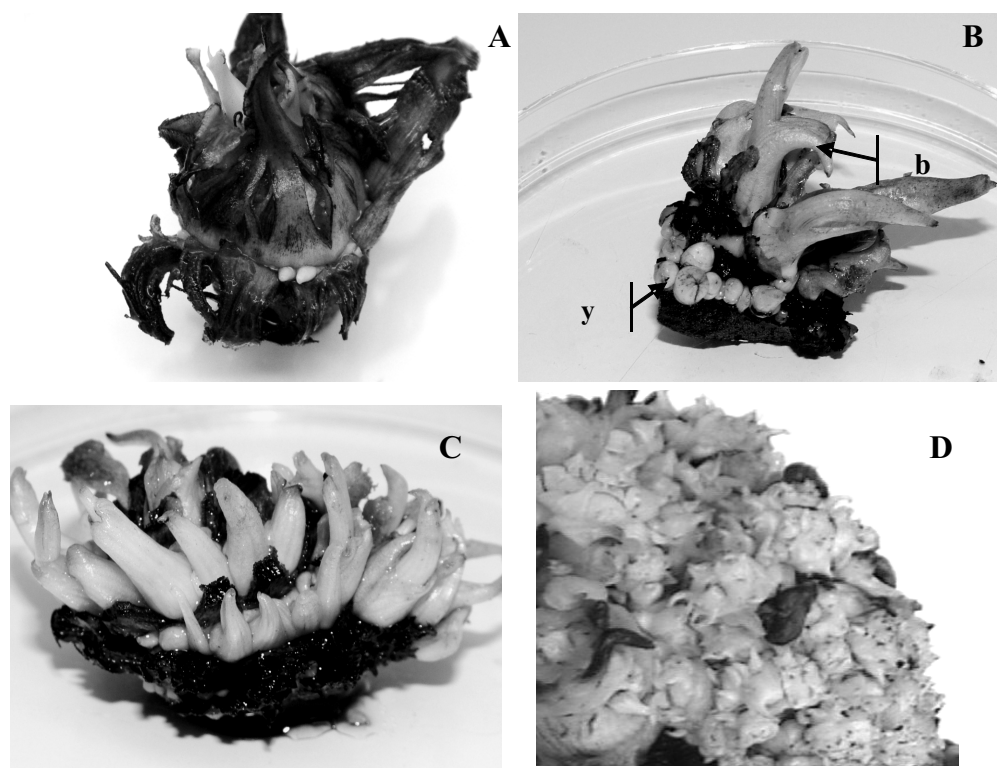


Figura 1. Evolución de la formación de yemas múltiples: A: Yemas axilares, B: Agregados de yemas múltiples (y) y brotes alargados (b), C: Brotes alargados, D: Yemas múltiples con primordios foliares.

Tabla 3

Efecto de diferentes tratamientos sobre la inducción de yemas múltiples. Los datos son promedios de cuatro experimentos independientes. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas por Duncan ( $p \leq 0,05$ ), ( $n=16$ )  $\pm$  Error estándar.

Tratamientos	Ciclos				
	1	2	3	4	5
T0	0	0	0,0a	0,0a	0,0 $\pm$ 0a
T1	0	0	69,0 $\pm$ 6,3d	149,5 $\pm$ 17,3c	166,5 $\pm$ 13,8e
T2	0	0	19,5 $\pm$ 1,5c	26,0 $\pm$ 2ab	31,0 $\pm$ 3cd
T3	0	0	8,3 $\pm$ 0,6ab	24,5 $\pm$ 5,2ab	36,0 $\pm$ 5,7d
T4	0	0	0,0a	0,0a	9,0 $\pm$ 0,1d ab
T5	0	0	16,5 $\pm$ 5,5bc	2,0 $\pm$ 8b	40,0 $\pm$ 8d
T6	0	0	0,6 $\pm$ 0,7a	5,4 $\pm$ 2,5a	9,8 $\pm$ 3,5ab

Tabla 4  
Efecto de diferentes tratamientos sobre la inducción de Brotes. Los datos son promedios de cuatro experimentos independientes. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas por Duncan ( $p \leq 0,05$ ), ( $n=16$ )  $\pm$  Error estándar.

Tratamientos	Ciclos				
	1	2	3	4	5
T0	6,0 $\pm$ 1,0a	63,0 $\pm$ 7,5c	15,0 $\pm$ 3,0a	63,5 $\pm$ 9,5b	71,0 $\pm$ 6,0c
T1	2,5 $\pm$ 0,7a	44,0 $\pm$ 0,7b	162,0 $\pm$ 3,5d	152,0 $\pm$ 0,7d	168,0 $\pm$ 0,7e
T2	5,0 $\pm$ 1,0a	44,0 $\pm$ 1,0b	137,5 $\pm$ 12,5c	131,5 $\pm$ 6,5c	137,5 $\pm$ 5,5d
T3	2,5 $\pm$ 0,63a	11,5 $\pm$ 2,8a	15,7 $\pm$ 0,9a	23,0 $\pm$ 1,9a	52,0 $\pm$ 2,9b
T4	3,5 $\pm$ 1,5a	10,0 $\pm$ 3,0a	12,5 $\pm$ 1,4a	13,0 $\pm$ 5,5a	13,5 $\pm$ 1,5a
T5	15,5 $\pm$ 4,5b	67,0 $\pm$ 8,0c	97,0 $\pm$ 1,5b	124,5 $\pm$ 1,0c	139,5 $\pm$ 1,0d
T6	2,0 $\pm$ 0,9a	9,0 $\pm$ 0,0a	15,4 $\pm$ 1,3a	19,0 $\pm$ 4,5a	24,2 $\pm$ 1,0a

de la varianza y distribución normal de los datos, para determinar grupos homogéneos a un nivel de significación del 5,0%.

## Resultados y Discusión

### Morfología de las Yemas Múltiples

En los dos primeros ciclos se observaron morfologías muy heterogéneas, con plántulas, brotes de tamaño reducido, grupos de yemas con diferentes grados de desarrollo de los primordios y ausencia de yemas aplanadas agrupadas sin primordios. A medida que se avanzó en los ciclos de cultivo en altas concentraciones de BA (100  $\mu$ M), se fue haciendo más homogénea la morfología de las estructuras obtenidas, predominando la formación de yemas aplanadas agrupadas y sin primordios. También, hasta el segundo ciclo de multiplicación ocasionalmente se formaron raíces.

Finalmente, en el quinto ciclo de cultivo se obtuvieron yemas con meristemos apretadamente empaquetados en estructuras tipo domo, con primordios foliares exigüos rodeando los grupos de meristemos aplanados como las descritas por Strosse y col. (12) (Figura 1). Sin embargo, es impor-

tante destacar que aunque hasta el quinto ciclo de cultivo en RITA se reportan una alta proliferación de yemas múltiples, aún existen yemas que muestran primordios diferenciados y tejido de reserva (Figura 1). En función de estos resultados se propone modificar el manejo de los explantes para favorecer la multiplicación de yemas múltiples. La reducción progresiva del tejido de reserva y del tamaño de los agregados durante cada ciclo de multiplicación, podría inhibir la diferenciación en brotes y favorecer la obtención de un mayor porcentaje de masas meristemáticas sin ningún tipo de tejido de reserva o tejido diferenciados como primordios foliares u hojas (12).

### Efecto de la Concentración de BA en la Formación de Yemas Múltiples

En esta investigación se logró inducir la formación de meristemos pequeños, aplanados y blancos a partir del tercer ciclo (Figura 1, Tabla 3) como los reportados por Schoofs (17), en altas concentraciones de BA (100  $\mu$ M). El BA desencadena en células que normalmente permanecerían quiescentes, una alta división celular y la consecuente diferenciación de brotes vegetativos supernumerarios (18). Esta reprogramación o desdi-

ferenciación celular induce a la formación de brotes adventicios en las células que responden a la citoquinina, lo que inhibe la diferenciación de primordios foliares y se observa la formación de *novo* de yemas adventicias originando una gran cantidad de agregados meristemáticos en forma de estructuras globulares densamente agregadas (18). La proliferación *in vitro* de meristemas adventicios depende de la concentración de la citoquinina en el medio. En *Musa*, la conversión de los meristemas en plantas es inhibida frecuentemente por una concentración de 100  $\mu\text{M}$  BA (16).

En el tratamiento 1 donde se induce la formación de yemas múltiples durante 5 ciclos continuos en 100  $\mu\text{M}$  de BA en RITA (Tabla 3, T1) se producen  $166,5 \pm 13,8$  yemas múltiples/explante mientras que en el tratamiento 2 donde se reduce la cantidad de 100  $\mu\text{M}$  de BA usada durante los dos primeros ciclos de multiplicación a 50  $\mu\text{M}$  para los tres ciclos subsiguientes, solo se inducen  $31 \pm 3$  yemas múltiples/explante (Tabla 3, T2). Estos datos muestran una drástica reducción en la inducción de yemas múltiples, debido a la disminución en la concentración de BA de 100  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , con diferencias significativas entre T1 y T2 ( $p \leq 0,05$ ). Mientras que sobre la diferenciación de brotes este efecto es menos marcado (Tabla 4, T1 y T2). A este respecto, cuando comparamos la formación de brotes en T0 y T1 (Tabla 4), también se observa que en RITA la tasa de multiplicación de brotes aumenta 2,36 veces cuando se incrementa el BA de 10 a 100  $\mu\text{M}$  mientras que en medio sólido (T3 y T4) se incrementó 3,9 veces. Estos datos muestran que aumentar las concentraciones de citoquininas en RITA tiene un efecto menos marcado sobre la inducción de brotes que en medio sólido. Colmenares y Giménez (15), reportan un índice de multiplicación para *Musa* (AAB) Plátano "Hartón gigante" de 11,2 brotes/explantes en RITA con 20  $\mu\text{M}$  de BA, luego de 30 días de cultivo. Comparando el índice de 6 brotes/explante del primer ciclo de T0 (Tabla 4, RITA, 10  $\mu\text{M}$

de BA) con lo reportado por Colmenares y Giménez (15), podemos observar el mismo efecto, donde al reducir la concentración de BA se reduce el índice de multiplicación casi a la mitad.

Es importante destacar que aumentar las concentraciones de citoquininas combinado con la inmersión temporal favorece la multiplicación y la producción de yemas múltiples (yemas adventicias) lo que puede tener un efecto sobre la variación somaclonal, por lo que se debe alcanzar un equilibrio entre la concentración de citoquininas, la inmersión temporal y la variación somaclonal. Schoofs, (17), estudió el efecto de las altas concentraciones de BA sobre la variación somaclonal en algunos cultivares y clones de *Musa* spp. Como resultado obtuvo que el cultivo en 100  $\mu\text{M}$  BA durante 8 ciclos, no incrementó la variación somaclonal.

En los tratamientos donde los explantes se cultivaron durante el primer ciclo en 10  $\mu\text{M}$  de BA (Tabla 3, T5 y T6), se redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la inducción de yemas múltiples, sea en sistemas RITA (Tabla 3, T5) o en medio sólido (Tabla 3, T6), en comparación con los inducidos desde el primer ciclo en 100  $\mu\text{M}$  de BA (Tabla 3, T1 y T3). Como muestran los resultados anteriores, la aplicación de 100  $\mu\text{M}$  de BA desde los primeros ciclos de multiplicación, es un factor crítico en la inducción eficiente de yemas múltiples. Adicionalmente, también es necesario mantener esta concentración de BA al menos hasta el cuarto o quinto ciclo de multiplicación para lograr una alta tasa de proliferación de yemas múltiples, como lo evidencia la comparación entre T1 y T5 (Tabla 4). Para la inducción de brotes este efecto es similar pero las diferencias son menos marcadas (Tabla 4, T3 y T6).

En los protocolos de propagación convencionales (19, 20), precultivan los microcormos en bajas concentraciones de BA (0,5 mg/L), para mejorar la respuesta y adecuación del explante a concentraciones más elevadas (2,5 a 5 mg/L) durante la fase de

multiplicación. Por otra parte, Schoofs, (17) subcultiva los meristemas utilizados para inducir yemas múltiples por lo menos por tres ciclos en medio p5 (10  $\mu$ M BA). A este respecto los resultados de la presente investigación, muestran que para *Musa* (AAB) Plátano "Hartón gigante" no son necesarios estos precultivos en p5, por el contrario, el subcultivo en p5 (10  $\mu$ M BA) disminuye la formación de yemas múltiples, con diferencias significativas entre T1, T5 y T3, T6 ( $p \leq 0,05$ ) (Tabla 4). Resultados semejantes fueron obtenidos por Colmenares y Giménez (21), donde se reporta la reducción del tiempo de iniciación de 60 días a solo 30, debido a que los cormos de campo pasan directamente a fase de multiplicación en 5 mg/L BA sin el precultivo por 30 días en 0,5 mg/L de BA.

#### Efecto de la Inmersión Temporal

En esta investigación el número de yemas múltiples por explante obtenidas para el quinto ciclo de multiplicación en 100  $\mu$ M BA y medio sólido fue de  $36 \pm 5,7$  (Tabla 3, T3), mientras que en RITA fue de  $166,5 \pm 13,5$  (Tabla 3, T1), obteniendo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre ambos tratamientos (T1 y T3). Esto indica que el cultivo en inmersión temporal tiene un drástico efecto sobre la proliferación de yemas múltiples que forman agregados meristemáticos. Al analizar el efecto de la inmersión temporal sobre la inducción de brotes diferenciados, se encuentra también un efecto significativo (Tabla 4, T1 vs T3).

Schoofs, (17), reporta que *Musa* (AAB) plátano "Agbagba" en medio sólido de proliferación p4 (100  $\mu$ M BA) requiere de cinco a siete ciclos de cultivo para obtener una adecuada proliferación de yemas múltiples competentes para la embriogénesis. Sin embargo, en esta investigación *Musa* (AAB) Plátano "Hartón gigante" venezolano muestra que en medio sólido con 100  $\mu$ M BA (Tabla 3 y 4, T3) nunca las yemas múltiples superan al número de brotes/explante, por lo que se clasifica como recalitrante en medio sólido, observándose una mayor diferenciación de

brotes que de yemas múltiples. Sin embargo, en RITA se observa que al quinto ciclo se igualan la inducción de yemas múltiples y brotes (Tabla 3 y 4, T1). Por otra parte, Dhed'a y col. (8) consideran como recalitrantes todos los cultivares que no forman meristemas múltiples con 10  $\mu$ M BA y requieren por lo menos un cultivo en medio con 100  $\mu$ M BA.

Strosse y col. (12), comparan la respuesta de diferentes clones de *Musa* (AAA) "Williams" provenientes de diferentes orígenes geográficos y reportan una amplia variación respecto a la respuesta en la producción de yemas múltiples y de su respuesta embriogénica. Estos mismos autores también reportan que para los plátanos estudiados (Agbagba, Obino l'Ewai y Orishele) se requieren de siete a once ciclos de proliferación en 100  $\mu$ M de BA para lograr la producción de yemas múltiples en medios sólidos. Esto indica que los índices de multiplicación son muy dependientes del cultivar, origen geográfico del mismo, del manejo inicial que se le haga al explante y el sistema de cultivo (sólido ó RITA).

Este efecto positivo que se observa en los envases RITA sobre la inducción de yemas y brotes se debe al uso de medios líquidos en contacto intermitente por periodos muy cortos, junto a la renovación de la atmósfera gaseosa que evita la acumulación de gases tóxicos (22). Para el cultivo de meristemas del banano FHIA-18 disectados en 4 partes y cultivados en RITA se obtienen 60 brotes por meristemo, mientras que en medio sólido se obtienen 12 brotes por explante inicial cultivado (23). Para el cultivar *Musa* (AAA) "Gran Enano" del subgrupo Cavendish, Alvard y Teisson (14) reportan un índice de multiplicación de 2,1 para medio sólido y 5,2 en inmersión temporal. Colmenares y Giménez, (15) reportaron para banano *Musa* (AAA) "Williams" un índice de multiplicación de 8,4 y 2,4 y para *Musa* (AAB) Plátano "Hartón gigante" de 11,2 y 4,3 en sistemas de inmersión temporal (20 min cada 4 h) y medio sólido respectivamente.



Cabe destacar que los resultados presentados en esta investigación son los primeros datos que muestran el efecto de la inmersión temporal para en la inducción de yemas múltiples, como explantes competentes para la inducción de embriogénesis somática.

### Conclusiones

El cultivo *in vitro* de microcormos de *Musa* (AAB) Plátano "Hartón gigante" en inmersión temporal RITA, aumenta significativamente la inducción de yemas múltiples en 100  $\mu$ M de BA.

La inmersión temporal y el aumento en la concentración de la citoquinina BA tienen un efecto sinérgico sobre el potencial de inducción de la diferenciación de brotes y proliferación de yemas múltiples.

Para lograr la formación de yemas múltiples en *Musa* (AAB) Plátano "Hartón gigante" se requieren por lo menos cuatro ciclos de multiplicación, en 100  $\mu$ M de BA.

El pre tratamiento con 10  $\mu$ M de BA durante los primeros ciclos de multiplicación de explantes provenientes de campo de *Musa* (AAB) Plátano "Hartón gigante" disminuye la inducción de yemas múltiples tanto en RITA como en medio sólido.

### Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ CC-0065-04) por el cofinanciamiento otorgado para la realización de esta investigación.

### Referencias Bibliográficas

1. ARIAS P., DANKERS C., LIU P., PILKAUSKAS P. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome. pp 1-87, 2003.
2. SÁGI L., REMY S., PANIS B., SWENNEN R., VOLCKAERT G. **Plant Cell Rep** 13: 262-266, 1994.
3. CROUCH J., VUYLSTEKE D., ORTIZ R. **Electron J Biotechnol** 1(1): 1-12, 1998.
4. NOVAK F., AFZA R., VAN DUREN M., PEREADALLOS M., CONGER B., XIOLANG T. **Bio/Tech** 46:125-135, 1989.
5. GRAPIN A., SCHWENDIMAN J., TEISSON C. **In Vitro Cell Dev-Pl** 32: 66-71, 1996.
6. GRAPIN A., ORTIZ J., LESCOT T., FERRIERE N., COTE F. **Plant Cell Tiss Org** 61: 237-244, 2000.
7. ESCALANT J., TEISSON C. **Plant Cell Rep** 7: 665-668, 1989.
8. DHED'A D., DUMORTIER F., PANIS B., VUYLSTEKE D., DE LANGHE E. **Fruits** 46:125-135, 1991.
9. DHED'A D. Culture de suspensions cellulaires embryogeniques et régénération en plantules par embryogénesis somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.) (Ph D. thesis) K.U. Leuven (Belgium) pp. 171, 1992.
10. MERKLE S., PARROTT W., FLINN B. **In Vitro Embryogenesis in plants**. (Ed Thorpe TA) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (Netherlands) pp. 155-203, 1995.
11. ESCALANT J., TEISSON C., COTE F. **In Vitro Cell Dev-Pl** 30: 181-186, 1994.
12. STROSSE H., SCHOOF H., PANIS B., ANDRE E., REYNIERS K., SWENNEN R. **Plant Sci** 170: 104-112, 2006.
13. SCHOOF H., PANIS B., STROSSE H., MAYO A., LÓPEZ J., ROUX N., DOLEZEL J., SWENNEN R. **InfoMusa** 8: 3-6, 1999.
14. ALVARD D., TEISSON C. **Plant Cell Tiss Org** 32: 55-56, 1993.
15. COLMENARES M., GIMÉNEZ C. **Rev Fac Agron** (LUZ) 20(4): 468-477, 2003.
16. VUYLSTEKE D. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Rome: **IBPGR** p. 56, 1989.
17. SCHOOF H. The origin of embryogenic cells in *Musa*. Profschirft voorgedragen tot het behalen van de graad (van Doctor) in de Toegepaste Biologische Wetenschappen door. Katholieke Universiteit Leuven faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische

- Wetenschappen. K.U. Leuven, Belgium. pp. 257, 1997.
18. BANERJEE N., VUYLSTEKE D., DE LANGHE E. Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. (Eds Withers LA and Anderson PG). UK: Butterworth Scientific Ltd. pp. 139-147, 1996.
  19. HARDY I., GARCÍA E. **PHYTON** 55: 31-41, 1994.
  20. VUYLSTEKE D., DE LANGHE E. **Trop Agr** 62: 323-328, 1985.
  21. COLMENARES M., GIMÉNEZ C. Nuevas estrategias para la inducción de brotes en Musáceas. **IV Latin-American meeting on plant biotechnology REDBIO 2001**. Goiania-Goiás, (Brasil). Extenso p. 20, 2001.
  22. JIMÉNEZ E., DE FERIA M. **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. (Ed Pérez, J). Instituto de biotecnología de las plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara (Cuba) pp. 207-222, 1998.
  23. VENTURA M., MEDERO V., LÓPEZ T., GARCÍA G., MORALES R., GARCÍA R., REYNALDO D. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, Palacio de Convenciones de la Habana-Cuba. pp 64, 1998.
  24. MURASHIGE T., SKOOG F. **Physiol Plantarum**. 15: 473-497, 1962.
  25. MOREL G., WETMORE R.H. **Am J Bot** 38:138-140, 1951.