

Obtención de Multimeristemas y Callos de Diferentes Variedades de Banano y Plátano (*Musa spp.*) a partir de “Meristemas Apicales” y “Scalps”

Ortega, N^(1,2); Korneva, S; Ruiz, O; Santos, E; Peralta, E⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral
Campus Gustavo Galindo, Km. 30 ½ Vía Perimetral
Apartado 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador
nortega@espol.edu.ec^(1,2); skorneva@espol.edu.ec⁽¹⁾

⁽²⁾ Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral
Campus Gustavo Galindo, Km. 30 ½ Vía Perimetral
Apartado 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

Resumen

Esta investigación tiene como objetivo la obtención de callos embriogénicos de vitroplantas de Musa spp.: Orito (genotipo AA), Barraganete (AAB), Dominicó (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA), en diferentes medios de cultivos (sólido y líquido) utilizando meristemas apicales y “scalps”. Las variedades triploides y Calcutta – 4 mostraron adecuada multiplicación in vitro en medio de cultivo con hormonas (BN) y sin hormonas (ITC – K). El medio de cultivo H1 líquido estimuló la formación de meristemas apicales de vitroplantas en callos embriogénicos, a corto plazo, condición necesaria para obtención de suspensiones celulares embriogénicas para su uso en transformación genética o propagación masiva. Mientras que los “scalps” de las variedades Barraganete y Williams se desarrollaron mejor en medio de cultivo TDZ, las demás variedades se desarrollaron mejor en medio de cultivo P4. Para la obtención de callos, el método de “scalps” fue más largo que el método de meristemas apicales en medio de cultivo líquido.

Palabra Claves: Meristemo apical, scalps, callos embriogénicos, *Musa spp.*

Abstract

This research is focus in the development of embryogenic calluses from in vitro plants of Musa spp.: Orito (genotype AA), Barraganete (AAB), Dominicó (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) and Calcutta – 4 (AA), in different culture media (solid and liquid) using apical meristem and scalps. The triploid varieties and Calcutta - 4 showed suitable in vitro multiplication in the culture media with hormones (BN) and without hormones (ITC – K). The culture medium H1 liquid stimulated the formation of apical meristems from plantlets in embryogenic calluses in short time, indispensable for the development of cell suspensions suitable for genetic transformation and mass propagation. While the scalps of the varieties Williams and Barraganete grew better on TDZ medium, the other varieties developed better in medium P4. For the development of calluses, the scalps method was longer than the apical meristem method in liquid medium.

Keywords: Apical meristem, scalps, embryogenic callus, *Musa spp.*

1. Introducción

Los bananos y plátanos son consumidos extensivamente tanto en los trópicos como en países de clima no tropical, apreciados por su sabor, gran valor nutritivo y por su disponibilidad durante todo el año. A nivel de país el banano se ha incrementado a más de 220.000 has, generando nuevas tasas de empleos para el agricultor ecuatoriano [1]. Según reportes de la Asociación de Exportadores de Bananos del Ecuador (AEBE) en el 2009 [2] a los 11 meses hubo un promedio semanal de cajas de banano de 5'143.340 y un promedio mensual de 22'443.666 cajas de 18,14 Kg.

Los cambios climáticos severos experimentados en las últimas décadas y los ataques de numerosas plagas y enfermedades, incluyendo la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), han afectado los rendimientos de banano y plátano en el Ecuador. El uso de pesticidas químicos para contrarrestar sus efectos, conducen a disminuir la rentabilidad de la producción y elevan la contaminación ambiental con riesgos sobre la biodiversidad y la salud humana.

Una de las alternativas para el manejo de la Sigatoka negra sería obtener nuevas variedades resistentes a la enfermedad mediante la transformación genética, para mejorar o introducir nuevas características. Los programas de ingeniería genética necesitan suspensiones celulares embriogénicas de alta conversión en plantas como material idóneo para estos propósitos [3].

Las técnicas de la embriogénesis somática fueron desarrolladas originalmente para lograr dos propósitos: la micropropagación masiva y el desarrollo de herramientas celulares para el mejoramiento genético. Estas técnicas se basan en el uso de reguladores sintéticos de crecimiento (auxinas) para inducir la dediferenciación de los tejidos y formación de tejidos embriogénicos (callos). El callo proporciona el material de inicio para el desarrollo de suspensiones de células embriogénicas (SCE). Para estas suspensiones, embriones son producidos y plantas son regeneradas [4].

El objetivo de este estudio es el de obtener callos embriogénicos de diferentes variedades de banano y plátano (*Musa* spp.): Orito (genotipo AA), Barraganete (AAB), Dominico (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA) a partir de vitroplantas y comparar la eficacia de dos métodos que incluyen el de meristemo apical y “scalps”. Este trabajo está orientado a confirmar si existen diferencias entre los dos métodos en cuanto al desarrollo y obtención de callos.

2. Materiales y métodos.

2.1 Fase 1: Introducción y establecimiento *in vitro* de cultivos de banano y plátano (*Musa* spp.).

Los cormos de *Musa* spp. (Orito, genotipo AA; Barraganete, AAB; Dominico, AAB; Morado, AAA) de plantas visiblemente sanas y robustas fueron recolectados en campo. Se seleccionaron entre 25 - 50 cormos de cada variedad en estudio. Luego de eliminar las raíces y los restos de tierra, fueron lavados con abundante agua corriente.

En el laboratorio, las muestras fueron reducidas a un tamaño aproximado de 5 cm. Para su desinfección estas fueron sumergidas en solución de hipoclorito de sodio al 4% durante 20 min.

Se traspasaron las muestras a frascos con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Se les realizaron más cortes longitudinales y transversales, reduciendo su tamaño hasta 1cm x 1cm y enjuagando las muestras con agua estéril luego de cada corte. Posteriormente se los sembró uno en cada frasco con medio de cultivo. Los domos meristemáticos sembrados fueron seccionados y resembrados en el medio fresco Murashige & Skoog modificado [5] cada mes hasta obtener el número de plantas adecuado para continuar con los demás experimentos.

De las variedades Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA) se utilizaron explantes provenientes de vitroplantas ya establecidas con anterioridad [6].

Fueron evaluadas 35 plantas por variedad en los medios de cultivo ITC – K que contiene ácido indolacético y kinetina; y el medio BN que contiene ácido indolacético, kinetina y bencil aminopurina al tercer y cuarto mes [6]. Para el análisis se realizaron dos tratamientos y 35 observaciones por variedad: medio de cultivo ITC – K y medio de cultivo BN.

El parámetro a evaluar fue el índice de multiplicación (IM) por variedad en tratamientos al tercer y cuarto mes cuando hubo presencia de plantas completas. En el análisis de datos se utilizaron tablas y gráfico generados en Excel 2007, paquetes estadísticos SPSS 12.0 e Infostat 2.0 (versión estudiantil). Para determinar la diferencia estadística significativa entre variedades ($p \leq 0.05$) se utilizó la prueba de diferencias de proporciones entre variedades y el índice de multiplicación de plantas (N^0 de brotes / N^0 de plantas).

2.2 Fase 2: Obtención de callos.

2.2.1 Obtención “scalps” o multimeristemas.

Los domos meristemáticos (3x3mm) fueron extraídos de las vitroplantas, puestos bajo oscuridad en

el medio de cultivo TDZ durante los dos primeros meses y luego en medio de cultivo P4 [4]. La misma cantidad de domos meristemáticos fueron puestos en oscuridad solo en medio de cultivo P4 durante todo el ensayo. El mantenimiento de las muestras se realizó cada seis semanas hasta obtener los multimeristemas en proliferación o “scalps”. Se evaluaron los domos meristemáticos sembrados, el porcentaje de fenolización, y el número aproximado de “scalps” por explante y variedad, en un período de 3-4 meses en los medios de cultivo TDZ y P4.

Los “scalps” obtenidos (4x4mm) fueron evaluados, explantados y sembrados al cuarto mes en medios de cultivo H1, FM1 y ZZ sólidos, en presencia de 2,4-D para la inducción de callos [6]. Se evaluó el desarrollo de callos por en cada medio de cultivo y se estimó el porcentaje de fenolización. Se tomaron fotos de estos explantes bajo estereo microscopio.

Los callos obtenidos se subcultivaron en tres diferentes medios de cultivo líquido FM1, ZZ y H1 [6] independientemente para su desagregación. Finalmente, se observaron las desagregaciones de los callos bajo el microscopio invertido para revelar la presencia de células embriogénicas y no embriogénicas [6].

Por cada explante (estructuras, scalps y callo) se realizaron seis tratamientos y 25 observaciones por variedad. Los tratamientos fueron los siguientes: T1, TDZ-P4-FM1; T2, TDZ-P4-ZZ; T3, TDZ-P4-H1; T4, P4-FM1; T5, P4-ZZ; y T6 P4-H1.

2.2.2 Obtención de callos a través de meristemas apicales.

Los meristemas apicales fueron extraídos de vitroplantas bajo observación con estereo microscopio realizando cortes de (1,5 - 2,0mm). Se los sembró en medio de cultivo H1 sólido (25 vitroplantas) y líquido (25 vitroplantas) (1mg L^{-1} 2,4 - D) [7] para la obtención de callos. Los medios líquidos fueron puestos en agitación en zaranda orbital rotatoria a 90 rpm, bajo oscuridad y a temperatura de 26°C .

Los callos obtenidos en medio de cultivo H1 sólido fueron resembrados en medio de cultivo H1 líquido en agitación para su mayor multiplicación. Se comprobó la embriogenicidad de los callos desagregados en medio de cultivo H1 líquido observando bajo microscopio invertido la presencia de células embriogénicas.

Se realizaron dos tratamientos (H1 sólido y H1 líquido) y 50 observaciones por variedad. Se evaluó el desarrollo de los callos entre 1-5 meses antes de cada resiembra de las diferentes variedades. Se observó el desarrollo de los tejidos y fenolización, en ambos casos se analizó el porcentaje respectivo.

Para el análisis de los datos en la fase 2 de los dos métodos (“scalps” y meristemas apicales) se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS 12.0, Infostat 2.0 (versión estudiantil), y Excel 2007. Para determinar diferencias estadísticas significativas entre las variedades se aplicó la prueba no paramétrica de Kurskall – Wallis con nivel de significancia al 5%.

3. Resultados y discusión.

3.1 Fase 1: Introducción y establecimientos *in vitro* de cultivos de banano y plátano (*Musa spp.*).

De las variedades en estudio introducidas y establecidas *in vitro*, las variedades Morado (AAA) y Barraganete (AAB) son mucho más productivas con promedio mayor a 0.8 de hijo por planta en ambos tratamientos (ITC-K y BN, Figuras 1 y 2). En las demás variedades también hubo producción de hijos pero con promedios inferiores (Figuras 1 y 2). Los resultados obtenidos en investigaciones anteriores en CIBE [4] sobre el promedio de hijuelos para las variedades de los siguientes genotipos tenemos: (AA) 1.81, (AAA) 1.61 y (AAB) 1.55 del promedio de hijos por variedad, son superiores a los promedios obtenidos en el presente estudio. Las variedades más productivas, Morado y Barraganete utilizadas en el presente trabajo, son triploides AAA y AAB, respectivamente. Por otro lado, variedades como Williams (AAA) y Calcutta - 4 (AA) presentaron promedios de ahijamiento de 0.34 y 0.74, respectivamente, y no presentaron resultados similares que en investigaciones anteriores [4] posiblemente por la senescencia celular ya que son cultivos establecidos y multiplicados constantemente para su mantenimiento. Se determinó en esta investigación que en los medios de cultivo ITC-K y BN, las variedades triploides se reproducen mejor en ambientes controlados y bajo diferentes concentraciones hormonales.

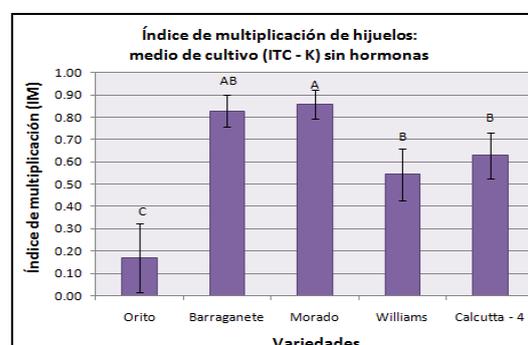


Figura 1. Índice de Multiplicación de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo (ITC - K) sin hormonas. Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia.

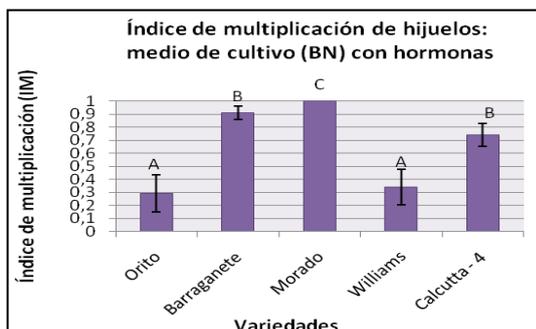


Figura 2. Índice de Multiplicación de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo (BN) con hormonas. Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

3.2 Fase 2: Obtención de callos.

3.2.1 Método de “scalps” o multimeristematos.

Los porcentajes de desarrollo de “scalps” fueron variables, inclusive dentro del mismo grupo genómico (Tabla 1). Es decir, las variedades Orito y Calcutta-4, que son los diploides acuminata (AA), poseen 29% y 65% de desarrollo de “scalps”, respectivamente. Asimismo, las variedades Morado y Williams, ambos triploides acuminata (AAA), poseen porcentajes de desarrollo de “scalps” muy diferentes (28% y 100%, respectivamente). Estos resultados indican una dependencia a nivel de variedad más que de genotipo. Trabajos realizados por Korneva et al. (2009) indican un desarrollo promedio de “scalps” de 68% (34 variedades evaluadas) y 66,2% (11 variedades evaluadas) correspondientemente a diploides acuminata (AA) y triploides acuminata (AAA), respectivamente. El desarrollo de “scalps” en la variedad Barraganete (AAB) fue mayor (80%) al promedio obtenido por Korneva et al. (2009) [6] que fue de 52% en 9 variedades evaluadas.

Tabla 1. Porcentaje de explantes de las variedades de banano y plátano (*Musa* spp.) en medios de cultivo TDZ y P4.

Explantos (%)	Medios de cultivo	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta - 4 (AA)
Subdivisiones de plantas	TDZ	44%	96%	72%	100%	81%
	P4	96%	76%	92%	96%	96%
Scalps	TDZ	29%	80%	28%	100%	65,33%
	P4	56%	40%	52%	96%	88%

El mayor porcentaje de desarrollo de callos a partir de “scalps” fue obtenido en la variedad Barraganete en medios ZZ y H1 provenientes de medio TDZ (52% y 56% respectivamente, Tabla 2). Mientras que en las variedades Orito, Barraganete y Morado el medio FM1 fue detrimente en comparación con los medios ZZ y H1 provenientes del medio TDZ. Para las variedades controles, Williams y Calcutta-4, se obtuvieron mayor

porcentaje de desarrollo de callos en medio FM1 en comparación con los medios ZZ y H1. En cambio, los mismos controles, el mayor porcentaje en los tratamientos P4 fue encontrado en el medio de cultivo ZZ (12% y 32% para Williams y Calcutta-4, respectivamente).

El mayor porcentaje de desarrollo de callos a partir de “scalps”, en los tratamientos provenientes del medio TDZ, de acuerdo al genotipo fue de: 56% (AAB), 20% (AA) y 32% (AAA). En el medio P4 el mayor porcentaje para las variedades de genotipo AA fue del 16%, AAB del 36% y AAA del 12%. Las variedades triploides en estudio dieron mejores resultados debido a sus características genéticas y la influencia de diversos medios de cultivo. Las variedades diploides generaron resultados no tan relevantes como las triploides.

Tabla 2. Porcentaje de desarrollo de callos por variedad a partir de “scalps”.

Explante (%)	Tratamientos	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta - 4 (AA)
Callos	TDZ	FM1	0	40	12	32
		ZZ	16	52	8	20
		H1	16	56	20	28
	P4	FM1	0	20	8	8
		ZZ	16	28	8	12
		H1	16	36	0	0

Los tratamientos usados para el desarrollo de callos provenientes del medio TDZ pertenecen a los tratamientos T1, T2 y T3.

Todas las variedades presentaron un alto porcentaje de finalización (Tabla 3). Sin embargo, solo se fenolizó la parte inferior de cada “scalps” y se subcultivaba solamente la parte superior que no presentaba fenolización (Figura 3).

Tabla 3. Porcentaje de fenolización por variedad en estudio.

%	Tratamientos	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta - 4 (AA)
Fenolización	T1	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T2	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T3	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T4	100%	100%	100%	100%	86,15%
	T5	100%	100%	100%	100%	86,15%
	T6	100%	100%	100%	100%	86,15%

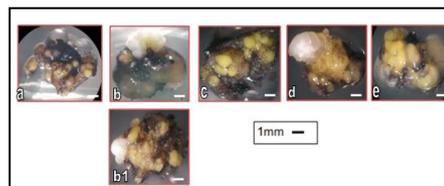


Figura 3. Desarrollo de callos de las variedades en estudio a partir de scalps. Orito (a), Barraganete (b, b1), Morado (c), Williams (d) y Calcutta-4 (e). La barra representa 1 mm.

3.2.2 Método de meristemo apical.

Las variedades Morado (AAA) y Orito (AA) en T2 mostraron completo desarrollo de los meristemas apicales a callos; mientras que para la variedad de Barraganete (AAB) el 66,7% de desarrollo de callos fue obtenido en T1 en un periodo de tiempo reducido 1–2 meses (Tabla 4). Las variedades de genotipos (AA) y (AAA) responden mejor a la inducción de callos en medio de cultivo H1 líquido. Este método es a corto plazo y de mejores resultados, lo que podría contrarrestar las dificultades de establecimiento de futuras suspensiones celulares embriogénicas de banano (Figura 4). En comparación con el método de “scalps”, el método de meristemo apical fue más rápido para la obtención de callo (de 2 a 4 meses). El método de “scalps” demora entre 8 a 12 meses para obtener callo.

Tabla 4. Porcentaje del desarrollo de callos en las variedades de banano y plátano (*Musa* spp.) bajo dos tratamientos.

Variedad	Porcentaje de desarrollo de callos	
	Medio H1 sólido	Medio H1 líquido
Orito	23,3	100,0
Barraganete	66,7	43,3
Dominico	80,0	80,0
Morado	86,7	100,0
Williams	66,7	80,0
Calcutta - 4	56,7	76,7

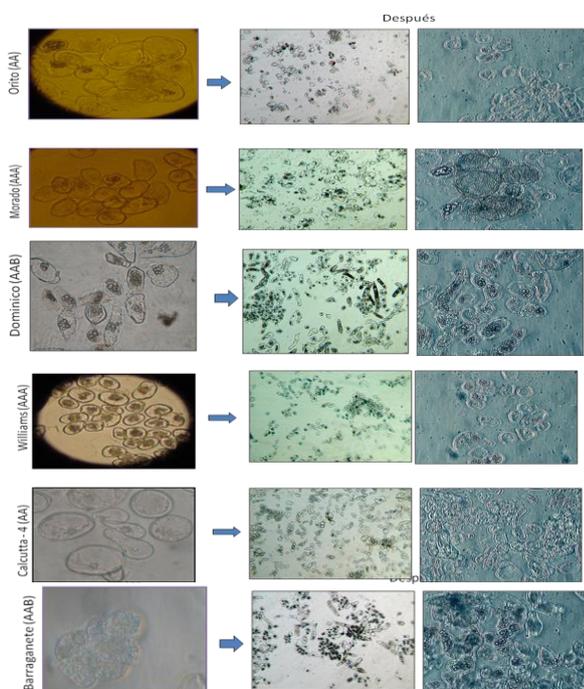


Figura 4. Observación de células embriogénicas de las diferentes variedades de *Musa* spp.

4. Conclusiones y recomendaciones.

4.1 Conclusiones

- Las variedades Morado (AAA) y Barraganete (AAB) por sus características genotípicas presentan buena capacidad de adaptación y reproducción bajo condiciones controladas *in vitro*.
- Las variedades Orito (AA) y Morado presentaron buen desarrollo de “scalps” en medio de cultivo P4, mientras que el Barraganete (AAB) en medio de cultivo TDZ.
- En ambos métodos de “scalps” y meristemo apical, la variedad Barraganete mostró mejores resultados de desarrollo de callos en comparación con las demás variedades.
- El método de meristemo apical en medio de cultivo H1 líquido para obtención de callos embriogénicos es menos laborioso y más efectivo que el método de “scalps”.

4.2 Recomendaciones

- Aumentar las concentraciones de antioxidantes en los medios de cultivo líquidos y sólidos, en obtención de callos y suspensiones celulares, para contrarrestar las fenolicaciones.
- Utilizar el método de meristemo apical en medio de cultivo H1 líquido debido a la rapidez para obtener los callos.

5. Agradecimientos

Este trabajo de investigación se logró gracias al apoyo de la SENACYT a través del proyecto No. PIC – 08 – 0000300, a los técnicos auxiliares de investigación Sr. Fernando Piña y Sr. Joffre Mendoza, y a los productores del sector de Baba que proporcionaron el material vegetal de inicio para esta investigación. De la misma manera agradezco al personal docente y jefes de área que participan en este proyecto por sus invaluable consejos.

6. Referencias Bibliográficas

- [1] VARGAS R. JOSÉ, Antecedentes de banana y/o plátano (Monografía disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos73/antecedentes-banano-platano/antecedentes-banano-platano2.shtml>, 2004).
- [2] AEBE (Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador), Reporte de Exportaciones Mensuales de

- Banano. Disponible en:
http://www.aebe.com.ec/data/files/DocumentosPDF/Estadísticas/2009/2doSemestre/ExportMen_Dic09.pdf, 2009.
- [3] KETCHUM, Elaboración de una planta transgénica: técnica de Biobalística, artículo N°28 del cuaderno del ¿Por que Biotecnología? Disponible en:
<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/.../cuaderno,2003-2004>.
- [4] STROSSE, H., DOMERGUE, R., PANIS, B., ESCALANT, J., CÔTE, F., Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano: pp. 5 - 31 Guías Técnicas INIBAP; 2003, Vol. N° VIII (8)
- [5] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497, 1962.
- [6] KORNEVA S.; MARIBONA R. H.; et al., Cryopreservation of different biological material obtained from plants of genre MUSA spp. (Memorias del 1ª International Symposium on Cryopreservation in Horticultural species, Leuven, Belgium, 5-8 april, pp.99), 2009.
- [7] DÍAZ E., et al., Morfogénesis de las Suspensiones Celulares de la Caña de Azúcar. *Biotecnología Aplicada* Vol. 8: pp. 59 – 60; La Habana, Cuba CIGB, 1991