

# EFFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA REPRODUCCIÓN *in vitro* DE *Musa* sp. CV GRAN ENANO

## EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON THE *in vitro* REPRODUCTION OF *Musa* sp. CV GRAN ENANO

Herrera-Aguilar, J.<sup>1</sup>; Aguirre-Medina, J.F.<sup>1\*</sup>; Gálvez-López, A.L.<sup>1</sup>; Ley-de Coss, A.<sup>1</sup>; Martínez-Solis, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV. Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical (MCPAT). Entronque Carretera Costera-Pueblo de Huehuetán, Huehuetán, Chiapas, México. C. P. 30660.

\*Autor de correspondencia: juanf56@prodigy.net.mx

### RESUMEN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV (UNACH) con el objetivo de determinar el efecto de dos reguladores del crecimiento tradicionales y un homobrasinólido (brasioesteroide) adicionados en dos concentraciones al medio MS en el crecimiento *in vitro* del clon de banano gran enano (*Musa* sp.). Se estableció en dos medios de cultivo con base a Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado, y tres reguladores del crecimiento BAP, AIA y Br en dos concentraciones de 2 mg L<sup>-1</sup> y 4 mg L<sup>-1</sup>, a pH de 5.6. Los explantes se incubaron a 26±1 °C, 60% H.R., I.L: 45 mE.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. En total 14 tratamientos con 10 repeticiones en un diseño completamente al azar. Se midieron, número de brotes, hojas, raíces y altura. Los resultados indicaron efecto diferencial entre medios de cultivo y concentraciones de reguladores del crecimiento. En la inducción radical el medio MS al 50% en interacción con AIA y Brasinoesteroide aumentaron el número de raíces en los explantes, mientras que el número de hojas lo aumentó BAP y Brasinoesteroide y disminuyó con AIA.

**Palabras clave:** brasinoesteroide, reguladores del crecimiento, concentraciones de medios MS

### ABSTRACT

The study was carried out in the Biotechnology Laboratory of the Agricultural Sciences School Campus IV (UNACH) with the objective of determining the effect of two traditional growth regulators and one homobrassinolide (brassinosteroid) added in two concentrations to the MS medium for the *in vitro* growth of Gran Enano banana (*Musa* sp.). It was established on two growth media based on modified Murashige and Skoog (MS) (1962), and three growth regulators, BAP, AIA and Br in two concentrations of 2 mg L<sup>-1</sup> and 4 mg L<sup>-1</sup>, at pH of 5.6. The explants were incubated at 26±1 °C, 60% H.R., I.L: 45 mE.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and a light period of 16 hours light and 8 darkness; in total, 14 treatments with 10 repetitions in a completely random design. The number of buds, leaves, roots and height were measured. The results indicated differential effect between growth media and concentrations of growth regulators. In the radical induction, the MS medium at 50 % in interaction with AIA and brassinosteroid increased the number of roots in the explants, while the number of leaves increased with BAP and brassinosteroid and decreased with AIA.

**Keywords:** brassinosteroid, growth regulators, MS media concentrations.

**Agroproductividad:** Vol. 10, Núm. 9, septiembre, 2017, pp: 20-25.

**Recibido:** agosto, 2017. **Aceptado:** septiembre, 2017.

## INTRODUCCIÓN

**El banano** (*Musa* spp.) es uno de los cultivos más importantes del mundo con mayor consumo por la población y en especial es alimento básico para millones de personas en los países en desarrollo. Su producción presenta diferentes problemas, especialmente con plagas, y por ello, se han diseñado diferentes prácticas de manejo integrado que combinan, entre otras, las aplicaciones de plaguicidas, utilización de cultivares resistentes y producción de plántulas micropropagadas (Koffi *et al.*, 2009). La micropropagación puede contribuir a solucionar algunos de los problemas en campo, especialmente cuando se dispone de nuevos materiales para ser establecidos en menor tiempo, en comparación con los procedimientos tradicionales de propagación. La propagación *in vitro* de algunos materiales presentan bajo coeficiente de multiplicación, alto porcentaje de fenolización de los explantes y baja supervivencia (Azofeifa, 2009; Aragón *et al.*, 2010). Se han reportado varias formulaciones de medios para cultivo de ápices de plátano con ligeras modificaciones del MS (Browning *et al.*, 1987) debido a que cada genotipo registra una determinada proliferación de yemas *in vitro* (Gübbük y Pekmezci 2004). En otros casos se han consignado brotes anormales o variantes somaclonales de las variedades de origen con algunos de los reguladores de crecimiento, incorporados al medio de cultivo (Izquierdo *et al.*, 2012), por ejemplo, variación genética y epigenética con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Li y Jin, 2007), y en el caso de citoquininas, tales como la zeatina, cinetina y 6-bencilaminopurina (6-BAP), que inducen aberraciones cromosómicas cuando se utilizan en concentraciones elevadas en los medios de cultivo (Aragón *et al.*, 2010, Bellarmino, 2007). Los reguladores del crecimiento no tradicionales, tales como los análogos de brasinoesteroides (ABr) y la mezcla de oligogalacturónidos (mOLG) se pueden utilizar como sustitutos de las auxinas y las citoquininas como alternativa para disminuir el riesgo de inducir variaciones genéticas en los procesos de multiplicación (Ali *et al.*, 2008, González *et al.*, 2005). Los brasinoesteroides son hormonas esteroidales esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, y su aplicación mejora su tolerancia a ciertos factores bióticos y abióticos, como sucedió con la aplicación del Bio-brás (6-ABr) que atenuó el estrés de altas temperaturas en el banano FHIA-18 (González *et al.*, 2005) y en el plátano FHIA-21, se favoreció la formación de raíces durante la fase de enraizamiento *in vitro* (Jiménez *et al.*, 2004). El Pectimorf (mOLG), por ejemplo, disminuyó el tiempo de emisión de brotes en los explantes del clon de plátano macho cv Sobrino durante su establecimiento (Díaz *et al.*, 2004). Con base en lo anterior, se determinó el efecto de dos reguladores del crecimiento de uso tradicional, y un homobrasinólido adicionados en dos concentraciones al medio MS en el crecimiento *in vitro* del clon de banano gran enano.

## MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV (UNACH), localizado en 15° 00' 25.02" N y 94° 23' 59.06" O, a 44 m de altitud. Se obtuvo el material vegetativo del clon Gran enano de una finca bananera localizada en el Cantón Corozal (15° 00' 32" N y 92° 93' 56" O), de Huehuetán Chiapas, México. Se seleccionaron hijos tipo espada (explantes), se desinfectaron con Azoxistrobin y se

dejaron reposar en Tween 80 por 30 minutos. Posteriormente se sumergieron en alcohol al 70% por un minuto. En Campana de Flujo Laminar se introdujeron en solución de NaClO al 3 % (v/v), por 20 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron reposar en antioxidante. Para la siembra del material en los medios de cultivo se realizaron cortes de 3 cm de longitud.

### Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado en dos concentraciones de sus componentes. Uno de ellos basado en el total de los ingredientes y el otro, con la mitad de los mismos. En ambos casos se agregaron los tres reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (BAP), Acido Indolacético (AIA) y Brasinoesteroide (Br) en dos concentraciones, 2 mg L<sup>-1</sup> y 4 mg L<sup>-1</sup>. El testigo fue el mismo medio completo MS sin reguladores de crecimiento. Además, a los medios se adicionaron 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; se ajustó el pH a 5.6 y solidificó con phytigel®. Con los componentes en cada medio se esterilizaron en autoclave a 15 PSI por 20 min. Los explantes se colocaron en magentas estériles selladas con 70 mL de medio de cultivo estéril y se establecieron en el cuarto de incubación (temperatura de 26±1 °C, 60% de humedad relativa, fotoperiodo de 16 h luz a 45 mE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 8 de oscuridad), donde permanecieron por 80 días en evaluación, con cambios de medio cada 30 días.

### Diseño experimental y Variables

Se tuvieron 14 tratamientos con 10 repeticiones, distribuidos en un diseño completamente al azar. Las variables registradas cada ocho días fueron: número de brotes, hojas,

raíces y altura del brote. Los resultados de las variables se graficaron con el programa Sigma Plot (ver. 10.0) de Jandel Scientific y se consideró el error estándar como medida de dispersión en los promedios. Con éste mismo programa se realizaron las correlaciones para encontrar la relación entre variables. Los resultados se analizaron mediante el programa GLM de SAS versión 8.1., y diferencias entre medias según Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

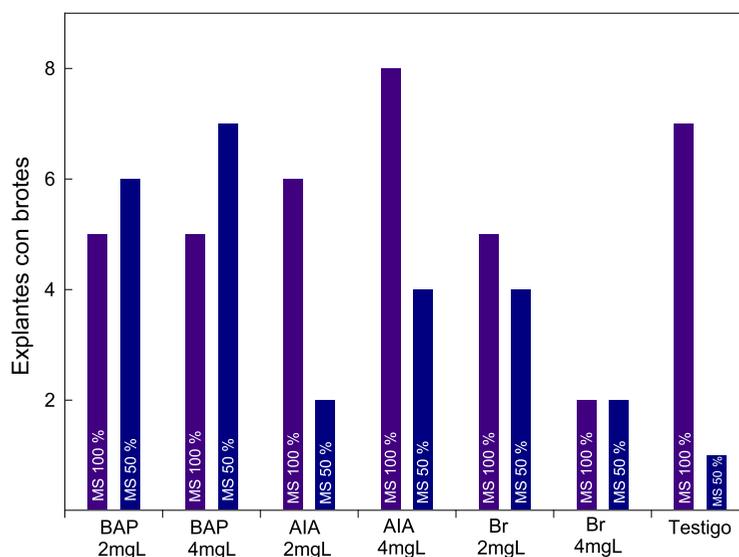
Se presentaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) entre las variables de acuerdo a la concentración de ingredientes del medio y los reguladores del crecimiento. Los explantes se incrementaron en el medio MS con las cantidades completas de los ingredientes cuando se aplicaron al mismo la auxina AIA y el Br, además del testigo. En cambio, al adicionar la citoquinina BAP al medio de cultivo MS con la mitad de sus componentes, se aumentó el número de explantes con brotes, en comparación al mismo medio de cultivo con los ingredientes completos. La respuesta fue ascendente, es decir, aumentó al incrementarse la concentración de 2 a 4 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1). Las citoquininas se caracterizan por la promoción de la división y expansión celular (Taiz, y Zeiger, 2002) que se expresan en gran capacidad de producción de brotes (Miranda-Furtado *et al.*, 2007).

Los resultados contrastantes entre las concentraciones de los ingredientes del medio MS en interacción con los reguladores del crecimiento sugieren la importancia de conocer los ingredientes de los medios de cultivo de tejidos vegetales con los productos químicos necesarios en buenas combinaciones y formas para cada cultivo (Huang y Murashige 1977). Las citoquininas como (BAP) y cinetina reducen la dominancia del meristemo apical e inducen formación de brotes axilares y adventicios de explantes meristemáticos en el banano (Gubbuk y Pekmzci 2004; Khalid 2011), pero la aplicación de altas concentraciones de BAP inhibe la elongación de meristemas adventicios y la conversión en plantas (Gubbuk y Pekmzci 2004; Khalid 2011). La interacción del medio MS con los ingredientes completos y la auxina AIA, también incrementaron el número de brotes conforme se aumentó la concentración en ambos medios.

### Altura del brote

La altura del brote se incrementó con el medio MS completo en sus concentraciones y fue estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) al medio que contiene la mitad de los ingredientes (Figura 2). En promedio la altura de los brotes en el medio MS con todos los ingredientes fue de 6.8 cm  $\pm 0.31$  y con la mitad de los mismos, alcanzó 5.9 cm  $\pm 0.28$ . El efecto de la combinación de los

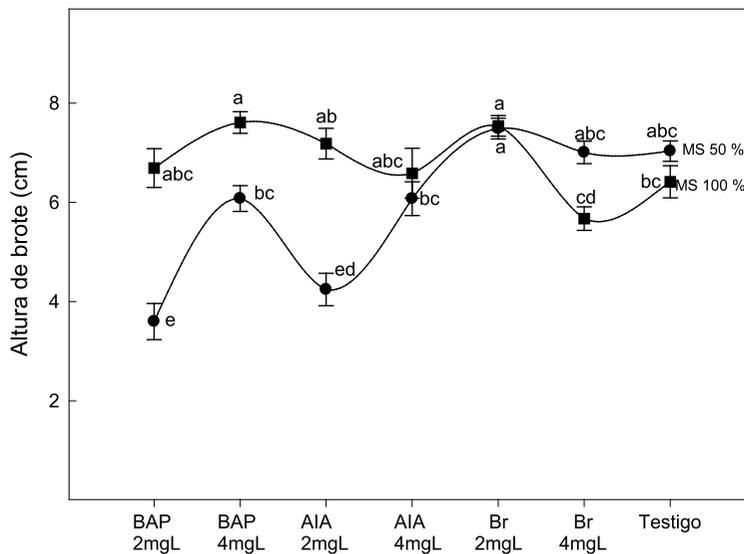
medios y los reguladores del crecimiento en la altura del brote fue menor con BAP en sus dos concentraciones y en los dos medios. Ferdous *et al.* (2015) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de BAP en ápices de dos cultivares de banano en medio MS y registraron que los brotes más largos (2.64 cm y 2.16 cm) fueron a partir de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Los reguladores del crecimiento, el ácido indolacético y la



**Figura 1.** Explantes con brote de *Musa* spp. cv Gran enano en dos medio de cultivo *in vitro* con diferentes reguladores del crecimiento. Los valores son promedios de diez repeticiones a la semana diez de muestreo.

benilaminopurina han sido considerados como parte de la regeneración *in vitro* de diversas plantas (Ali *et al.*, 2014). Se sabe que las citoquininas tales como la benilaminopurina (BAP) reducen la dominancia del meristemo apical (Madhulatha *et al.*, 2004).

En cambio el incremento más alto en la altura del brote se presentó con la inclusión del Br y el AIA. El efecto de los homobrasinóidos a bajas concentraciones en los procesos morfogénéticos, como sustitutos o complementos de las auxinas y citoquininas son muy efectivos (González *et al.*, 2005). Son



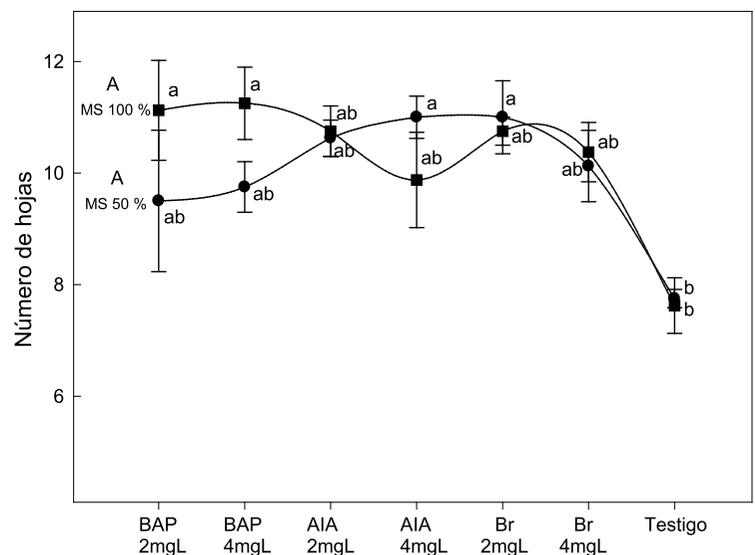
**Figura 2.** Altura del brote de plátano cv gran enano creciendo en dos medios de cultivo *in vitro* y diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento. Los valores son promedios de ocho repeticiones  $\pm$  error estándar a la semana 10 de muestreo. Las letras que no son iguales indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$  %). CV=13.1%.

metabolitos que tienen la capacidad de estimular el crecimiento vegetal (Teixeira y Adam, 2002) en segmentos de diferentes órganos y explantes (Salgado *et al.*, 2008). Hernández *et al.* (1999) citan mayor altura en *Solanum tuberosum* L., crecidas *in vitro*, después de 30 días de edad, al agregar al medio de propagación  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Biobrás-6. En banano clon FHIA-18 se ha demostrado que el brasinoesteroide puede ser utilizado con éxito en todas las fases de la micropropagación masiva, en sustitución de auxinas usualmente utilizadas (Nuñez *et al.*, 2014). El número de hojas aumentó en los medios donde se incluyó algún regulador del crecimiento en comparación con el testigo (Figura 3).

En esta variable, el aumento de mayor contraste fue con el medio base MS en interacción con BAP, y comparado con los otros reguladores del crecimiento. Este mismo efecto ha sido consignado con BAP en *Stevia rebaudiana* Bert (Jagatheeswari y Ranganathan, 2012). En cambio, en el medio MS con la mitad de sus componentes se indujeron más hojas con AIA en concentración de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  y Br en  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Izquierdo *et al.* (2012) demostraron que la inmersión de las vitro plantas de banano clon FHIA-18 en soluciones de Biobrás-6, estimuló el desarrollo y el número de las hojas. En otros cultivos se ha encontrado respuesta semejante con la aplicación de los Br en el incremento en la expansión celular de las hojas

(Hu *et al.*, 2000; Nemhauser y Chory, 2004). Terry *et al.* (2011) citan incremento en el desarrollo foliar de lechuga *Lactuca sativa* L. con la aspersión foliar de Biobras-16 y Cortés *et al.* (2003) señalan que los Br promueven acumulación de citoquininas endógenas que favorecen la regeneración de brotes adventicios en hipocótilos de coliflor, en cotiledones de pimentón y en callos de *Spartina* bajo condiciones *in vitro*. El Br se encuentra en forma natural en los ápices de muchas plantas (Teixeira y Adam, 2002) y su aplicación favorece el incremento promedio del número de hojas a 11.2, y los tratamientos con BAP presentaron en promedio 10.4 hojas, con la dosis más baja de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . La eficacia de BAP sobre otras citoquininas en la inducción de la multiplicación de los ápices ha sido citada en diferentes cultivares de banano (Buah *et al.*, 2010) como un suplemento a los medios basales MS y su efecto en estimular el crecimiento de los brotes axilares y yemas adventicias también en el desarrollo foliar de diversos cultivos (Buah *et al.*, 2010). El número de raíces aumentó en el medio MS a 50% de sus componentes con o sin la inclusión de AIA y Br en comparación con BAP (Figura 4).

Las auxinas en el cultivo *in vitro*, inducen la formación de raíces, mientras que las citoquininas promueven formación y crecimiento de brotes (North *et al.*, 2012). El mayor número de raíces de 7.8 fue con Brasinoesteroide ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), y con 6.9 AIA a razón de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Según



**Figura 3.** Número de hojas del plátano cv Gran enano en dos medios de cultivo y diferentes reguladores del crecimiento *in vitro*. La línea vertical indica  $\pm$  error estándar de 8 repeticiones. Las letras que no son iguales indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$  %). CV=18.9%.

Garcés (2011), al aplicar Br a las plantas se mejora el crecimiento de las raíces. Suárez (2007) al trabajar con las orquídeas, *Cattleya leuddemanniana* y *Guarianthe skinneri* con repetidas aspersiones foliares de BB-16 (0.05 mg L<sup>-1</sup>) incrementó el número de raíces. El aumento de raíces por Br se ha reportado anteriormente en otras especies, por ejemplo, Terry *et al.* (2011) citan que la aspersión foliar de BB-16 también favoreció el crecimiento radical en *Lactuca sativa* L. En papa *Solanum tuberosum* L. variedad Desirée, Hernández *et al.* (1999) mostraron incrementos en la biomasa radical de las plántulas de 30 días de edad crecidas *in vitro*, al enriquecer el medio con BB-6 a razón de 1 mg L<sup>-1</sup>. En este mismo cultivo, se demostró que la inmersión de vitro plantas en soluciones de BB-6, o BB-16 solas o en combinación con ANA, antes de la transferencia a la fase *ex vitro*, resultó positiva para las vitro plantas al aumentar desarrollo radical (Núñez *et al.*, 2014).

## CONCLUSIONES

El número de brotes, altura y número de hojas aumentaron en el medio MS con los ingredientes completos y el sistema radical cuando se adicionó la mitad de los ingredientes. La altura del brote presentó efecto diferencial entre los medios de cultivo y las concentraciones de reguladores del crecimiento. En cambio, en el número de hojas se incrementaron con BAP y Brasinoesteroide y disminuyeron con AIA.

## LITERATURA CITADA

Ali B., Hayat S., Fariduddin Q., Ahma, A. 2008. 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 72, 1387-1392.

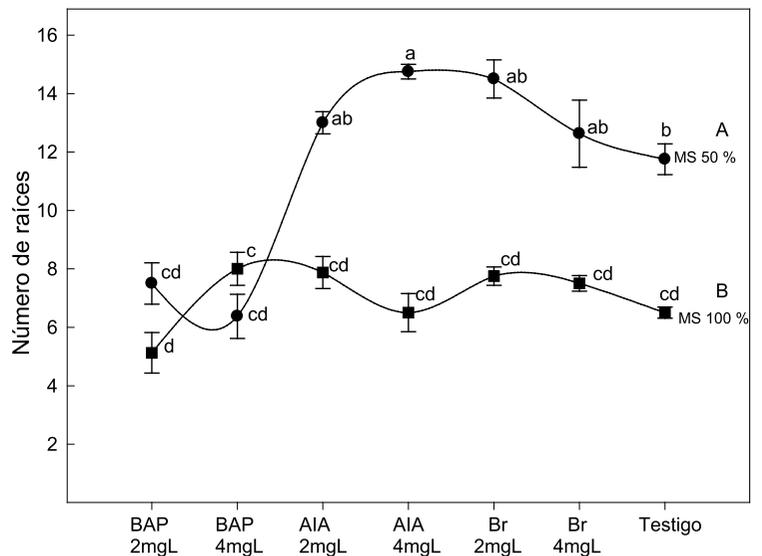
Aragón C., Carvalho L., González J., Escalona M. & Amancio S. 2010. Ex vitro acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. *Biol. Plantarum*, 54 (2), 237-244.

Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20 (1) 153-175.

Bellarmino A. 2007. Genes involved in brassinosteroids's metabolism and signal transduction pathways. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50 (4), 605-618.

Browning G., Ognjanov V., Passey A., James, D. 1987. Multiple shoot and root regeneration from pear embryo cotyledon explants in Vitro. *Journal of Horticultural Science*, 62, 305-311.

Cortes P.A., Terrazas T., León, T.C., Larque-Saavedra A. 2003. Brassinosteroid effects on precocity and yield of cladodes of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill). *Scientia Horticulturae*, 97: 65-73.



**Figura 4.** Número de raíces de banano cv Gran enano creciendo *in vitro* en dos medios de cultivo con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. La línea vertical indica  $\pm$  el error de 8 repeticiones. Las letras que no son iguales indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$  %). CV=17.4 %

Díaz B.R., Héctor E., Torres A., Cabañas M., Garcés N., Izquierdo H. 2004. Empleo de productos bioactivos cubanos como sustitutos de los reguladores del crecimiento en la propagación del plátano macho (AAB). I. Fase de establecimiento *in vitro*. *Alimentaria*, 51(359):103-7.

Garcés P. 2011. Acción de Brassinolinas sobre el Rendimiento y Calidad en Aguacate *Persea americana*. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador. 31-36.

González O.J.L., Córdova A., Aragón C.E., Pina D., Rivas M., Rodríguez R. 2005. Effect of an analogue of brassinosteroid on FHIA-18 plantlets exposed to thermal stress. *InfoMusa*, 14 (1), 18-20.

Gübbük H., Pekmezci M. 2004. In Vitro Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, 355-361.

Hernández R.M., Moré O., Núñez M. 1999. Empleo de análogos de brasinoesteroides en el cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 20 (4): 41-44.

Hu Y.X., Bao F., Li J. 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 24: 693-701.

Huang L.C., Murashige T. 1977. Plant Tissue Culture Media: Major constituents, their preparation and some applications. *Methods in Cell Science*, 3, 539-548.

Izquierdo H., González M.C., Núñez M., Proenza R., Álvarez I. 2012. Efectos de la aplicación de un análogo espirostanico de brasinoesteroides en vitroplantas de banano (*Musa* spp.) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales*, 33 (1): 71-76.

Jagatheeswari D., Ranganathan P. 2012. Studies on Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3 (2), 315-320.

Jiménez F.A., Ramírez D., Agramonte D. 2004. Use of Biobras-6 in micropropagation of 'FHIA-21'. *InfoMusa*, 13 (1) 4-6.

- Khalid N. 2011. Effect of Benzylaminopurine (BAP) Pulsing on *in Vitro* Shoot Multiplication of *Musa acuminata* (Banana) cv. Berangan. African Journal of Biotechnology, 10, 2446-2450.
- Koffi M.C., De la Providencia I.E., Annemie Elsen A., Declerck S. 2009. Development of an *in vitro* culture system adapted to banana mycorrhization. African Journal of Biotechnology, 8 (12): 2750-2756.
- Li J., Jin H. 2007. Regulation of brassinosteroid signalling. Trends Plant Sci., 12, 37-41.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 437-497.
- Nemhauser J.L., Chory J. 2004. "Bring it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action". Journal of Experimental Botany, 55 (395): 265-270.
- North J., Ndakidemi P., Aubscher C. 2012. Effects of Antioxidants, Plant Growth Regulators and Wounding on Phenolic Compound Excretion during Micropropagation of *Strelitzia Reginae*. International Journal of Physical Sciences, 7, 638-646.
- Núñez V.M., Reyes G.Y., Rosabal A.L., Martínez G.L. 2014. "Análogos espiroestánicos de brasinoesteroides y sus potencialidades de uso en la agricultura". Cultivos Tropicales, 35(2):34-42.
- Salgado G.R., Cortés Rodríguez M.A., Del Río R.E. 2008. Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. Biológicas, No. 10: 18-27.
- Statistical Analysis System (SAS). 1999-2000. SAS/STAT user's Guide: Ver 8.1 SAS Institute Inc. Cary NC, USA: SAS Institute Inc.
- Suárez L. 2007. Efecto que ejercen las aspersiones foliares de una mezcla de oligogalacturonidos (Pectimorf) y la formulación a base de un análogo de brasinoesteroides (Biobras-16) en dos especies de orquídeas (*Cattleya leuddemanni* y *Guarianthe skinneri*). Cultivos Tropicales, 28 (4):87-91.
- Teixeira Z.M.A., Adam G. 2002. Brassinosteroid phytohormones -structure, bioactivity and applications. Brazilian Journal of Plant Physiology, 14 (3) 143-181.
- Terry E., Ruiz J., Tejeda T., Reynaldo I., Díaz M.M. 2011. Respuesta del cultivo de la lechuga a la aplicación de diferentes productos bioactivos. Cultivos Tropicales, 32(1): 77-82.

