

Avances en las aplicaciones biotecnológicas en banano (*Musa spp.*) cultivar Cien Bta03, y en el ecotipo de piña (*Ananas comosus* L. Merr), Tãbe Kãnã nativa del Amazonas Venezolano

EVA DE GARCÍA, HÉCTOR BLANCO, ADRIANA PINEDA, AMALIA BRITO,
LUIS HERMOSO, MARCIA ESCALA Y TERESA E. VARGAS

Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas - Venezuela.
Correo-e: eva.cristina.garcia@gmail.com

Las investigaciones de banano y plátano en el laboratorio de biotecnología del IBE, se iniciaron en el área de la micropropagación clonal, y alcanzaron metas más complejas como el mejoramiento genético, mediante variación somaclonal para banano, y mediante ingeniería genética para ambos, banano y plátano. En esta trabajo nos referiremos a los estudios del cultivo *in vitro* de meristemas florales masculinos de la variedad élite Cien Bta 03, sometidos a la inducción de una combinación del medio nutritivo de Murahige y Skoog (8), con la adición 5 mg l⁻¹ de BAP y 15% de agua de coco, y reportaremos diferentes procesos diferenciación. En los estudios de piña, hemos reportado con la propagación *in vitro* de varias variedades y ecotipos (3, 2, 4, 9). A partir del 2009 estos estudios se enfocaron en la clonación de ecotipos de piña autóctonos del Amazonas venezolano con el fin fortalecer el sistema agrícola de la comunidad Piaroa de esa región. Para la entrega de ese material es necesario la evaluación de su estabilidad genética. En este trabajo presentamos los resultados del análisis de marcadores morfoanatómicos de vitroplantas de Tãbe Kãnã, como indicadores de su estabilidad genética.

Introducción

La fruticultura en Venezuela ocupa el tercer lugar dentro del sector agrícola vegetal. Existen 167.691 Ha de frutales y una producción 2.232.088 TM por año. Se producen comercialmente una docena de rubros frutícolas, siendo los principales: plátano, banano, naranjo y piña (1). El banano ocupa la cuarta posición en la producción de rubros vegetales detrás del arroz, caña de azúcar y maíz; la piña está el quinto lugar, el plátano el sexto y el naranjo el séptimo (5).

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Biología Experimental, desde hace más de veinte años nos hemos dedicado a la aplicación de la biotecnología a la multiplicación clonal y mejoramiento genético de algunos cultivos frutales: parchita (*Passiflora edulis*), mandarina (*Citrus nobilis*), mango (*Mangifera indica* L), banano, plátano (*Musa spp.*) y piña (*Ananas comosus* L. Merr). Para el caso de la parchita, mandarina y mango se han estudiado los procesos de organogénesis, embriogénesis somática y multiplicación por esquejes, para incrementar la población de individuos élites mediante la propagación *in vitro*.

El banano, es una fruta de alto consumo en nuestro país, sin embargo se ha observado una gran disminución en la producción de este cultivo desde el año 2000, cuando Venezuela ocupaba la posición 15 entre los veinte países de mayor producción en el mundo, en el 2001 Venezuela ocupó la posición 18 y

para el 2002 ya no aparecía entre los veinte países de mayor producción mundial. Un ejemplo de esta situación es que en el año 2003, se contabilizó solo el 50% de producción con respecto al año 1994, alcanzando un nivel de 492.232 toneladas. De acuerdo a los datos de la FAO (5) la producción de banano no ha mejorado en estos últimos años alcanzando para 2010, un valor de 412.100 toneladas. Esta problemática nos ha inducido a estar constantemente actualizando nuestros métodos propagación *in vitro* de variedades de bananos elites, en esta oportunidad analizaremos aspectos del cultivo *in vitro* de ápices de inflorescencia, y de flores masculinas de *Musa spp.*, cultivar Cien Bta 03, resistente a las Sigatocas amarilla y negra.

En relación a la piña (*Ananas comosus*) es otro fruto de gran importancia económica y de consumo en Venezuela, se cultiva en los estados Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Monagas, Anzoátegui, Sucre y los márgenes del Río Orinoco en el Estado Amazonas (6). Específicamente en el municipio Átures del estado Amazonas se han descrito 11 ecotipos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), los cuales son cultivados, principalmente, por aborígenes de la etnia Piaroa, (Loswóthüa, en el idioma indígena) de Betania del Topocho, constituyendo la misma una actividad frutícola que forma parte de su cultura ancestral, entre los ecotipos importantes comercialmente se encuentra el Tãbe Kãnã.

En las Memorias del Instituto de Biología Experimental (4), presentamos los resultados de la micropropagación clonal del ecotipo Tãbe Kãnã, en este trabajo presentaremos los resultados de la evaluación mediante marcadores morfoanatómicos, de la estabilidad genética de las vitroplantas obtenidas en esos procesos.

Cultivo de ápices de inflorescencia, y flores masculinas de Musa spp., cultivar Cien Bta 03

En trabajos de investigación previos se ha logrado para banano la formación de embriones somáticos y brotes vegetativos, mediante el cultivo de ápices vegetativos (11), y más recientemente se obtuvo la regeneración de plantas mediante el cultivo de meristemas de flores masculinas (7). En el presente trabajo analizaremos los aspectos morfológicos de los procesos de diferenciación en cultivo *in vitro* de ápices de inflorescencias y de flores masculinas del banano cultivar Cien Bta 03.

Materiales y métodos

Se recolectaron inflorescencias masculinas de plantas banano Cien Bta 03 en Ocumare de la Costa, estado Aragua. En el laboratorio las inflorescencias se redujeron a 2,5 cm de largo, se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% por 5 min y luego se realizó un enjuague con agua destilada esterilizada. Luego se trabajó con 2 tipos de explantes: a) manos florales extraídas de la zona ubicadas entre los nudos siete a dieciséis, contados a partir del ápice floral y b) ápices de inflorescencias de 1,5 cm de largo. Ambos tipos de explantes se sembraron en frascos con medios constituidos por el medio MS (8), con la adición de 5 mg l⁻¹ de BAP y 15% de agua de coco, sacarosa 30 g l⁻¹ de sacarosa, 8g l⁻¹ de agar. Los tejidos fueron incubados en una cámara de crecimiento a 30 ± 2°C, bajo luz continua.

Resultados y Conclusión

En el análisis morfológico se observó que los tejidos de las flores masculinas, presentaron aumento de tamaño a las cuatro semanas y luego de seis meses desarrollaron dos tipos de estructuras diferentes: a) formación de callos blancos, relativamente compactos con aspecto heterogéneo, b) formación de callos grisáceos y/o pardos, acuosos, con aspecto friable. Estos tipos de callos se pudieron observar en la mayoría de los cultivos (**Figura 1A**).

Después de nueve meses en cultivo, se observó en algunas flores la formación de estructuras nodulares blancas y verdes, éstas últimas similares a estructuras organogénicas. También se observaron estructuras pequeñas, hialinas redondeadas. (**Figura 1B**).

Adicionalmente, se observó en algunos casos un proceso de diferenciación totalmente diferente, en el cual los tejidos de las flores desarrollaron tejidos que semejan una bráctea de color verde que cubre a un grupo de estructuras compactas alargadas pequeños con la forma del fruto del banano (**Figura 1C**).

El cultivo del ápice de la inflorescencia se observa en **la Figura 1D**, en la cual se observa restos de brácteas y en la base se encuentran estructuras blanquecinas, alargadas, compactas, de superficie lisa.

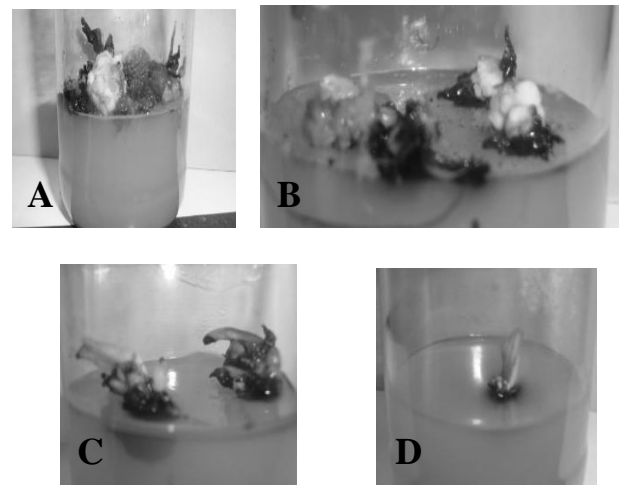


Figura 1: A) Diferentes tipos de callos. B) Estructuras nodulares verdes, hialinas y blancas C) Brácteas cubriendo estructuras semejantes a frutos (bananos) pequeños. D) ápice de inflorescencia con estructuras blancas

Todos este procesos de diferenciación aquí descritos serán analizados mediante estudio morfoanatómico.

Evaluación de marcadores morfoanatómicos en vitroplantas de Tãbe Kãnã como indicadores de su estabilidad genética.

Los análisis de parámetros morfo anatómicos en poblaciones obtenidas *in vitro* constituye una primera e importante aproximación de la estabilidad genética de la población. Esos caracteres constituyen marcadores que nos permiten detectar variaciones en individuos de dicha población, los cuales pueden ser de origen genético.

Materiales y métodos

Los parámetros evaluados en el aspecto morfológico fueron: coloración de las hojas, en haz y el envés, textura de la hoja y presencia de agujerones en la base o borde de las hojas jóvenes y maduras.

Para la evaluación anatómica, las hojas se cortaron, separando la zona basal y la zona media, y se colocaran en frascos diferentes con alcohol isopropílico al 70% para su preservación. Se

realizaron cortes transversales y paradérmicos a mano alzada, de la parte media y parte basal de las hojas de las dos variedades. Los cortes fueron teñidos con azul de Toluidina, fijados con glicerina al 30% y se realizó el montaje para su observación al microscopio. Se utilizó como control cortes sin teñir para detectar posibles artefactos generados por la tinción.

La anatomía se observó a través de los microscopios ópticos Nikon 14 MLAB-2 y Nikon OPTIPHOT, este último con un polarizador de luz incorporado, y finalmente se tomaron fotografías de los mejores cortes anatómicos con una cámara digital colocada sobre los oculares de ambos microscopios. Para una identificación y descripción apropiada de los diferentes tejidos foliares de las variedades amazónicas de piña, se utilizó como guía el texto de Tomlinson (13), sobre anatomía de las monocotiledóneas, junto con otras referencias bibliográficas.

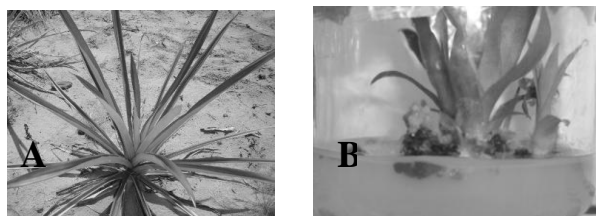


Figura 2:
A) Planta madre de Tãbe Kãnã. B) Vitroplanta de Tãbe Kãnã

Resultados y Discusión

Todas las hojas presentaron agujones antrosos, de consistencia fuerte. En relación a este aspecto, en trabajo previo (9), donde se realiza un análisis anatómico comparativo, entre las hojas de plantas del ecotipo Tãbe Kãnã obtenidas por organogénesis y mantenidas *in vitro*, con respecto a la planta madre, se observó que las hojas de las vitroplantas presentaron márgenes con agujones desde un estado de desarrollo muy temprano, al igual que en la planta madre. Las hojas de la planta en el campo presentan tonos naranja o rojizos, y en condiciones de vivero e *in vitro* son de color verde.

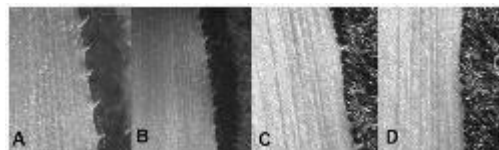


Figura 3. Hojas de plantas del ecotipo Tãbe Kãnã:
A) Planta madre B) Planta madre *in vitro*, C) Vitroplanta hija *ex vitro* y D) Vitroplanta hija *in vitro* Aumento 10X

En las secciones transversales de la lámina foliar de plantas micropropagadas de piña cultivadas *in vitro* y en el vivero, se pudo observar que éstas presentaron un mesófilo equifacial donde no se distinguen parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, contrariamente al mesófilo dorsiventral reportado por Santa Cruz y col. (12) en la región central de hojas de piña. En las dos condiciones de cultivo *in vitro*, la lámina foliar presentó un parénquima acuífero constituido por células grandes redondeadas, con paredes delgadas, planas o con leves ondulaciones y de menor tamaño que las células hipodérmicas, debido a las condiciones de alta humedad en el microambiente. En general todas las plantas en condiciones de *in vitro* y *ex vitro* presentaron escamas peltadas, cristales tipo rafidio, 2 líneas de haces vasculares y no presentaron aerénquima.

Conclusiones

No se encontraron diferencias anatómicas entre las hojas de las plantas mantenidas *in vitro* (madres e hijas) con respecto a las hojas de las plantas madres mantenidas en vivero, salvo las características propias de las plantas cultivadas *in vitro*, las cuales se revirtieron al realizar la aclimatación. Estas observaciones nos permiten recomendar la organogénesis como un método eficiente para la propagación clonal de este ecotipo.

Agradecimiento: Los autores agradecen a FUDECI, al CDCH de la UCV y a FONACIT, por el financiamiento a estas investigaciones.

Referencias

1. **Aular, J. y Casares, M.** (2011). Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. **Rev. Bras. Frutic.** **33:** 187-198
2. **Blanco, H., Vargas, T.E. y De García, E.** (2011) Micropropagación clonal de tres variedades de piñas nativas de la región amazónica mediante el cultivo de yemas axilares y apicales. **Interciencia.** **36 (6):** 337-443.
3. **Casale, I. y De García E.** (1987). Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. **ACEVIV Vol. 2:** 3-18.
4. **De García, E., Blanco, H., Pineda, A. y Vargas T.E.** (2012). Micropropagación masiva de plantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) del ecotipo amazónico Tãbe Kãnã vía cultivo de yemas y embriogénesis somática. **Memorias del IBE. Vol. 6:** 189-192.
5. **FAOSTAT 2012** [En línea] <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

6. **Leal F. y Avilan L.** (1982). Áreas potenciales para el desarrollo de diferentes especies frutícolas en el país. III. La piña. **Revista Venezuela Facultad de Agronomía.** Universidad Central de Venezuela. Vol. **31**: 283-300.
7. **Mahadev, S. H., Kathithachalam, A., Marimuthu M.** (2011). An efficient protocol for large-scale plantlet production from male floral meristem of *Musa* spp. cultivars Virupakshi and Sirumalai. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant.** **47**: 611-617.
8. **Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497.
9. **Pineda, A.** (2009). Establecimiento de un sistema de embriogénesis somática y de organogénesis *in vitro* en *Ananas comosus* (L.) Merr. **Trabajo Especial de Grado de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias.** Universidad Central de Venezuela. 93p.
10. **Pineda, A., Vargas, T. E., Escala M., y De García, E.** (2012). Organogénesis *in vitro* en piña ‘Española roja’ y morfoanatomía de las plantas obtenidas en el proceso. **Bioagro** **24**: 175-186.
11. **Ramírez, M., De García, E.** (2008). Obtainment of embryogenic cell suspensions from scalps of the banana CIEN BTA-03 (*Musa* sp., AAAA) and regeneration of the plants. **Electronic Journal of Biotechnology** **11**: 1-10.
12. **Santa Cruz, S., Graciano-Ribeiro, D., Batista, J., Aquino, T. y Copati, L.** (2006). Anatomia Foliar de Plantas Micropropagadas de Abacaxi. **Pesq. Agrop.** **41**: 185-194.
13. **Tomlinson, R.B.** 1970. Monocotyledons: towards an understanding of their morphology and anatomy. In: **RD Preston, ed. Advances in botanical research**, pp. 207–292. Academic, New York.