

Notas Científicas

Micropropagación y estimativa de producción de mudas de bananos para la Amazonia Occidental

Janiffe Peres de Oliveira⁽¹⁾, Frederico Henrique da Silva Costa⁽²⁾ y Jonny Everson Scherwinski-Pereira⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Acre, BR 364, Km 4, CEP 69915-900 Rio Branco, AC, Brasil. E-mail: janiffepoliveira@hotmail.com ⁽²⁾Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3.037, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: fredericohenrique@yahoo.com.br ⁽³⁾Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900 Brasília, DF, Brasil. E-mail: jonny@cenargen.embrapa.br

Resumen – El objetivo del trabajo fue de determinar tasas de multiplicación y estimar la producción in vitro de microplantas de las cultivares del banano Preciosa, Maravilha, Pacovan Ken y Japira, durante seis subcultivos y con diferentes concentraciones de BAP. Después de multiplicadas, las microplantas enraizadas fueron aclimatadas, y la sobrevivencia fue determinada después de 30 días. Las tasas de multiplicación fueron de 2,3 y 2,1 brotes por explante de 'Preciosa' y 'Maravilha', respectivamente, y 2,7 brotes por explante de 'Pacovan Ken' y 'Japira', en 4 mg L⁻¹ de BAP. Las pérdidas por contaminación fueron de 22,4%, y la sobrevivencia por lo menos 96%.

Términos para indexación: *Musa* sp., aclimatación, resistencia a la enfermedad, tasas de multiplicación.

Micropropagation and estimates of banana plantlets production for Western Amazon

Abstract – The objective of this work was to determine multiplication rates and to estimate the in vitro plantlets production of the banana cultivars Preciosa, Maravilha, Pacovan Ken and Japira, during six subcultures at different BAP concentrations. After the multiplication, the rooted microplants were acclimatized, and the survival was determined after 30 days. Multiplication rates reached 2.3 and 2.1 shoots per explant of 'Preciosa' and 'Maravilha', respectively, and 2.7 shoots per explant for 'Pacovan Ken' and 'Japira', in 4 mg L⁻¹ of BAP. Losses due contamination were 22.4%, and seedlings survival was superior to 96%.

Index terms: *Musa* sp., acclimatization, disease resistance, multiplication rate.

En los últimos años, el mercado consumidor de banana viene incrementándose y consecuentemente causa la elevación del precio de los frutos, hecho por el cual, hubo una amplia adopción del cultivo en varios estados brasileños. Así, el requerimiento de mudas de banano, con elevada calidad genética y fitosanitaria que pueden proporcionar frutos de calidad, presentó un incremento significativo (Oliveira et al., 2001). El uso de mudas de banano, obtenidas por micropropagación, ha crecido significativamente en Brasil, con el objetivo de atender a la demanda por mudas de calidad, principalmente en regiones donde se hace cultivo comercial. Las principales ventajas de este método, comparado con los medios tradicionales de propagación, son: la posibilidad de multiplicación en gran escala de variedades seleccionadas con elevada pureza genética y fitosanitaria, en períodos de tiempo y espacio físico reducidos, sin interrupción estacional, además de la rápida disponibilidad y validación

de nuevos materiales obtenidos por programas de mejoramiento genético (Oliveira & Silva, 1997; Costa et al., 2008).

Sin embargo, mientras esta técnica sea implementada en el país, algunos banales siguen siendo establecidos convencionalmente, por medio de propágulos obtenidos en campo y de plantas enfermas, sin ningún control, a ejemplo de muchas áreas de cultivo en Amazonia, lo que, en ausencia de mudas certificadas, no garantizan la sanidad y producción de la plantación (Costa et al., 2008). En razón de esto, en los últimos años, Embrapa ha estudiado y seleccionado cultivares resistentes a los principales factores limitantes del cultivo de esta especie, los cuales actualmente están siendo recomendados para plantíos en los estados brasileños, especialmente los de Amazonia, para permitir el establecimiento de banales más tecnificados y productivos. Para la multiplicación y difusión acelerada de esas mudas, se ha utilizado el cultivo de tejidos, que depende mucho

del establecimiento de un protocolo eficaz y seguro, que propicie una alta tasa de propagación de bananos in vitro (Debiasi et al., 2002). Mientras, las tasas de propagación tienen amplia variabilidad, en razón del genotipo utilizado. Zaffari et al. (1995) y Oliveira et al. (2001) afirman que entre los diversos factores relacionados a la micropropagación, el explante (su origen, tamaño, fase y manejo empleado) ejerce fuerte influencia en las subsecuentes respuestas obtenidas in vitro.

El objetivo del trabajo fue de determinar las tasas de multiplicación in vitro de bananos resistentes a enfermedades para la Amazonia Occidental brasileña y estimar el número potencial de mudas para producción en una escala de tiempo, en razón de los subcultivos.

Se utilizó como fuente de explantes el material vegetal de las cultivares de banano Maravilha (FHIA 01 AAAB), Preciosa (PV 4285 AAAB), Pacovan Ken (PV 4268 AAAB) y Japira (PV 42.142 AAAB), seleccionadas en el Programa de Mejoramiento Genético de Embrapa Mandioca y Fruticultura, colectadas en el mes de enero del Banco Activo de Germoplasma de banano, perteneciente a Embrapa Acre, en la Amazonia Occidental brasileña. Después de la cosecha de ápices caulinares en el campo, se realizaron tres desinfecciones: la primera en NaOCl a 1%, por una hora; en seguida, fue realizada una prelimpieza del material, para eliminar el exceso de pseudotallo. Posteriormente, se hizo una nueva desinfección por 30 min en NaOCl a 1% y, después, el material fue colocado en la cámara de flujo laminar, donde fue hecha nueva desinfección con CaOCl₂ a 1% por 10 min. Después de cada desinfección se realizó el enjuague de los explantes en agua destilada y autoclave por tres veces consecutivas. El rizoma fue reducido a aproximadamente 1 cm³ y establecido en tubos de ensayo (25x150 mm) con 10 mL de medio MS (Murashige & Skoog, 1962). El pH del medio fue ajustado a 5,8±0,1 antes de la adición de agar y del autoclavaje por 15 min a 121°C y 1,3 atmósfera de presión; y el material permaneció posteriormente en una sala de crecimiento a 25±2°C y intensidad luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹. A los 30 días del establecimiento, el material que no presentó contaminación aparente fue multiplicado, partido por la mitad y transferido para frascos de 250 mL de capacidad, con 30 mL de medio de cultivo MS enriquecido con diferentes concentraciones de N⁶-benzilaminopurina (BAP) (0, 2, 4 e 6 mg L⁻¹). Cada tratamiento fue evaluado

mensualmente, durante seis subcultivos consecutivos; y en cada subcultivo, fueron colectados datos sobre el número de brotaciones de cada explante en cada cultivar estudiada. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, en esquema factorial 4x4x6, con cuatro genotipos, cuatro concentraciones de BAP y seis subcultivos, en el total de 96 tratamientos. En el subcultivo 0 (establecimiento), fueron utilizadas 15 repeticiones por tratamiento, en que cada repetición fue formada por un ápice caulinar. En los demás subcultivos, fueron utilizadas cinco repeticiones con cinco brotes cada. La estimación del número de mudas producidas por explante fue obtenida a partir de la determinación de la tasa media de brotaciones (TM), la cual se obtuvo al final de seis subcultivos, en razón del número de subcultivos (ns) realizados: número de mudas producidas por explante = TM^{ns}.

La aclimatación fue realizada en noviembre, con la metodología desarrollada por Oliveira et al. (2008). Al final del sexto subcultivo, las mudas fueron enraizadas en medio MS desprovisto de reguladores de crecimiento. Después de esto, las mudas micropropagadas con 8 a 10 cm de altura fueron retiradas del medio y lavadas en agua corriente, para eliminarse el exceso de medio de cultivo. En seguida, fueron transferidas para un vivero, cubierto con film de polietileno transparente (150 μm) y malla de sombreado (50% de intercepción luminosa) y, posteriormente, fueron colocadas en macetas de plástico de 180 cm³, con sustrato compuesto por estiércol de bovino, tierra de bosque y cascarilla de arroz carbonizada en la proporción 3:1:1 (v/v), desinfectado previamente con formol (ácido fórmico) a 2,5%. La irrigación de las plantas se hizo por medio de aspersores localizados a aproximadamente 1,2 m de altura, donde fueron acomodadas las macetas, con flujo nominal de 60 L m⁻² por hora, controlado por un cronómetro digital ("timer"). Durante las dos primeras semanas, las mudas fueron sometidas a periodos de irrigación de 15 min a cada tres horas, y después de ese periodo, cada ocho horas, por 15 min. Las macetas fueron acomodadas en bandejas suspensas a 0,50 m del suelo del vivero. Durante el crecimiento de las plantas, no se realizaron tratamientos fitosanitarios. Las plantas permanecieron en ese vivero por un periodo aproximado de 30 días, siendo la tasa de sobrevivencia evaluada cuando llegaron a una altura media de 15 cm. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza y las medias comparadas por el test de Scott-Knott, a 5% de probabilidad.

Las tasas medias de multiplicación observadas fueron de 2,3 brotes por explante en el cultivar Preciosa, 2,1 brotes por explante en Maravilha y 2,7 brotes por explante en las cultivares Pacovan Ken y Japira, en la concentración de 4 mg L⁻¹ de BAP (Cuadro 1). Este resultado fue semejante al obtenido por Costa et al. (2006), en experimento con la cultivar Grande Naine. A partir de las tasas medias observadas en esta concentración de BAP, el número de brotaciones acumuladas, al final del sexto subcultivo, tuvo una variación entre 85,8 y 387,4 brotes por explante, y el mayor número de brotaciones acumuladas por explante (387,4) fue verificado en las cultivares Pacovan Ken y Japira. En la media, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de 4 y 6 mg L⁻¹ de BAP para las cultivares Preciosa y Maravilha. En la cultivar Maravilha también no se observaron diferencias entre las concentraciones de 2, 4 y 6 mg L⁻¹ de BAP, las cuales presentaron medidas semejantes entre sí, en torno de 2,1 brotes por explante; este genotipo presentó las menores medias para la tasa de multiplicación. Esto comprueba los resultados obtenidos por Banerjee & De Langhe (1985) de que la tasa de multiplicación puede presentar variaciones en consecuencia del genotipo, y incluso Oliveira et al. (2001), que afirman que la tasa de multiplicación y el desarrollo in vitro de las plantas dependen de la elección de la mejor concentración de BAP.

En el análisis individual de las cultivares, se observó que a lo largo de seis subcultivos, Preciosa (con un total de 4.738,5 brotaciones, a partir de 15 explantes iniciales establecidos) y, de ese total, el tratamiento con 4 mg L⁻¹ de BAP proporcionaron la tasa de multiplicación de 46,8% del total (2.220 brotaciones acumuladas) y una tasa acumulada de 148 brotes por

explante, a pesar de que el índice de pérdida de explantes fue de 22,4%, aún en la fase de establecimiento, en razón de contaminaciones bacterianas (Cuadro 2). Para esta cultivar, se observó diferencia a partir del segundo subcultivo entre las concentraciones de BAP utilizadas, en que las de 4 y 6 mg L⁻¹ presentaron los mejores resultados, sin diferencia entre sí con medias de 2,3 y 2,2 brotes por explante, respectivamente (Cuadro 1). La cultivar Maravilha, a pesar de presentar 35,8% de pérdidas por contaminación bacteriana y 1,5% de pérdidas de los explantes por contaminación fúngica, al inicio de los subcultivos, alcanzó el total de 2.185,6 brotaciones al final del sexto subcultivo. Las cultivares Japira y Pacovan Ken acumularon un total de 3.935,3 y 3.143,4 plantas, respectivamente, y las pérdidas fueron, de 39,3% en la cultivar Japira y de 19,5% en el cultivar Pacovan Ken, solamente por contaminación bacteriana, durante la fase de establecimiento (Cuadro 2). En general, los mejores resultados, en cuanto a la tasa de multiplicación, fueron observados después del tercer subcultivo, lo que corrobora el trabajo de Oliveira & Silva (1997).

Se verificó que independientemente de la cultivar las pérdidas por contaminación bacteriana se fueron reduciendo a lo largo de los cultivos, y que fueron mayor durante la fase de establecimiento (Cuadro 2). Según Pereira et al. (2003), a pesar de que las contaminaciones fúngicas también ocasionan importantes pérdidas materiales, las contaminaciones bacterianas son las más serias, en razón de su difícil detección inicial, ya que pueden ser transferidas de un material a otro durante los sucesivos subcultivos. A diferencia de la contaminación bacteriana, la contaminación fúngica puede ser verificada fácilmente a lo largo de los

Cuadro 1. Tasas de multiplicación (brotes por explante) y estimativa de producción de mudas de las cultivares de banano Preciosa, Japira, Maravilha y Pacovan Ken, a partir de yemas apicales durante el cultivo in vitro, después de seis subcultivos en medio con diferentes concentraciones de BAP⁽¹⁾.

Subcultivo	Concentraciones de BAP (mg L ⁻¹)															
	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
	-----Preciosa-----				-----Japira-----				-----Maravilha-----				-----Pacovan Ken-----			
0 ⁽²⁾	1,0cA	1,0cA	1,0dA	1,0cA	1,0aA	1,0cA	1,0dA	1,0dA	1,0bA	1,0cA	1,0cA	1,0dA	1,0aA	1,0bA	1,0dA	1,0cA
1	2,0aA	2,0bA	2,0cA	2,0bA	2,0aA	2,0bA	2,0cA	2,0cA	2,0aA	2,0aA	2,0bA	2,0bA	2,0aA	2,0aA	2,0cA	2,0bA
2	1,1cB	1,3cB	1,8cA	2,0bA	1,0aB	1,5cB	1,3dB	2,2cA	1,0bA	1,3cA	1,4cA	1,4cA	1,3aA	1,4bA	1,8cA	1,1cA
3	1,5bC	2,6aB	3,8aA	2,7aB	1,7aC	2,5bB	3,0bA	3,7aA	1,2bB	2,8aA	2,8aA	2,7aA	1,1aD	2,7aC	4,4bA	3,6aB
4	1,1cB	1,9bA	2,1cA	2,2bA	1,3aC	4,0aB	4,8aA	3,5aB	1,0bC	1,7bB	2,6aA	1,7cB	1,7aB	2,8aA	3,5aA	3,1aA
5	1,5bC	2,5aB	3,3aA	2,6aB	1,5aC	2,4bB	3,6bA	2,8bA	1,5aB	2,3aA	2,6aA	2,5bA	1,2aB	2,4aA	3,0bA	2,7aA
6	1,5bC	2,2aB	2,5bB	2,9aA	1,3aC	2,6bB	4,0bA	2,3cB	1,3bB	2,4aA	2,6aA	3,0aA	1,5aB	2,3aB	3,3bA	3,0aA
Media	1,4C	1,9B	2,3A	2,2A	1,4C	2,3B	2,7A	2,5B	1,3B	2,0A	2,1A	2,0A	1,4D	2,1C	2,7A	2,3B
Tme ⁽³⁾	7,5	47	148	113,4	7,5	148	387,42	244,1	4,8	64	85,76	64	7,5	85,76	387,42	148

⁽¹⁾Medias seguidas de las mismas letras, minúsculas en la columna y mayúsculas en la línea, no difieren entre sí por el test de Scott-Knott, a 5% de probabilidad.

⁽²⁾Fase de establecimiento. ⁽³⁾Tasa de multiplicación estimada.

Cuadro 2. Evaluación de las pérdidas por contaminación fúngica y bacteriana, a lo largo de seis subcultivos in vitro de las cultivares de banano Preciosa, Maravilha, Japira y Pacovan Ken.

Subcultivo	Tasa de contaminación (%)							
	Fúngica				Bacteriana			
	Preciosa	Maravilha	Japira	Pacovan Ken	Preciosa	Maravilha	Japira	Pacovan Ken
0	0,0	1,5	0,0	0,0	22,4	35,8	39,3	19,5
1	0,0	0,0	0,0	3,0	18,0	19,0	14,3	22,7
2	4,4	5,9	0,0	0,0	22,0	14,7	0,0	0,0
3	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	1,3	0,0	0,0	7,1	8,0	8,5	3,6	0,0
5	0,6	1,6	7,1	0,0	8,4	19,6	0,0	0,0
6	0,9	1,7	0,0	0,0	1,9	3,7	0,0	3,6

subcultivos, y es generalmente ocasionada por un inadecuado manejo de las condiciones asépticas. En este trabajo, las cultivares que presentaron los mayores índices de pérdidas, en consecuencia de la proliferación de hongos fueron Pacovan Ken y Japira, en los subcultivos 4 y 5, respectivamente, en aproximadamente 7% de los explantes.

Durante la aclimatación de las plantas producidas en laboratorio, se observó la tasa de sobrevivencia media de 96% de las mudas, las cuales presentaron la altura media de 17,1 cm a los 30 días después del plantío. Las pérdidas observadas durante esta fase fueron 4%, número inferior al obtenido por Oliveira et al. (2001), que trabajaron con la cultivar FHIA-01 y obtuvieron 6% de pérdida. En el presente trabajo, durante la aclimatación, las mudas presentaron aspecto vigoroso y no fueron observadas modificaciones morfológicas en el material, lo que indica que las condiciones propuestas para la producción de mudas de banano fueron adecuadas.

Las tasas medias de multiplicación son de 2,7 brotes por explante en las cultivares Pacovan Ken y Japira, 2,3 brotes por explante en Preciosa y 2,1 brotes por explante en Maravilha, en medio de cultura MS suplementado con 4 mg L⁻¹ de BAP. Después de seis subcultivos, se obtiene en media 387,4 mudas de las cultivares Pacovan Ken y Japira, y 148 y 85,8 mudas de Preciosa y Maravilha, respectivamente, por propágulo inicialmente establecido.

Agradecimientos

Al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por el apoyo financiero al proyecto y becas concedidas; a Milenka Sadith Iturralde Escobar, por la revisión del español.

Referencias

- BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, v.4, p.351-354, 1985.
- COSTA, F.H. da S.; PASQUAL, M.; SANTOS, A.M. dos; CASTRO, E.M. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Modificações na anatomia foliar de bananeiras durante o processo de micropropagação. **Interciencia**, v.33, p.663-667, 2008.
- COSTA, F.H. da S.; PEREIRA, J.E.S.; PEREIRA, M.A.A.; OLIVEIRA, J.P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶-benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grande Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.280-283, 2006.
- DEBIASI, C.; ZAFFARI, G.R.; SALERNO, A.R.; GUERRA, M.P. Correlação entre a capacidade proliferativa in vitro e a dominância apical in vivo da bananeira cvs. Grand Naine e Nanicão. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.597-600, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, J.P. de; COSTA, F.H. da S.; PEREIRA, J.E.S. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Ocidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, p.459-465, 2008.
- OLIVEIRA, R.P. de; SILVA, S. de O. e. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.415-420, 1997.
- OLIVEIRA, R.P. de; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S. de O. e. Concentração de BAP e a eficiência da micropropagação de bananeira tetraplóide (Grupo AAAB). **Scientia Agricola**, v.58, p.73-78, 2001.
- PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R. de L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.827-834, 2003.
- ZAFFARI, G.R.; SOLIMAN FILHO, L.F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra da dominância apical sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira in vitro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.17, p.37-42, 1995.

Recibido el 9 de junio de 2008 y aceptado el 23 de septiembre de 2008