ANALIZADO

CONTRIBUCIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA EN EL MEJORAMIENTO DE BANANOS Y PLÁTANOS

Margarita Perea Dallos

RESUMEN

Los avances de la Biotecnología en bananos y plátanos se han desarrollado con mucho interés por varios grupos de investigación a nivel mundial lo que ha constituido un pilar para el mejoramiento de los cultivos de *Musáceas.* Las células vegetales que conforman los tejidos y órganos de las plantas recurren a numerosas estrategias para acceder a los recursos de nutrición suministrados a través de los procesos *in vitro;* razón por la cual se considera importante estudiar y comprender la estructura celular, los organelos su función y metabolismo. Los procesos de regeneración de plantas en *Musa* han permitido la limpieza de plagas y enfermedades, propagación rápida de líneas superiores e implementación de bancos de germoplasma. En lo que concierne al mejoramiento de algunos clones de plátanos y bananos de importancia agronómica mediante la utilización de la variación somaclonal, el cultivo de anteras, los protoplastos y obtención de híbridos, además de la transferencia de genes y la biología molecular ha sido la contribución más valiosa a las técnicas convencionales de integración en los programas de mejoramiento genético para el desarrollo de los cultivos. El interés de contribuir a la producción y/o creación de nuevos cultivares de *Musa* imponen unas exigencias al agricultor quien se ve obligado a mejorar sus cultivos. En este trabajo se presentan los resultados de numerosos esfuerzos que constituyen un excelente aporte a la solución de la problemática de las Musáceas.

ABSTRACT

Progress on biotechnology in bananas and plantains has been developed with great interest with several research groups all over the world wish is one of the bases for *Musa* breeding. Cells, tissues and organs of plants take several strategies in order to take the nutrition through *in vitro* conditions. This is one of the reasons to study the cellular structures, organells as well their function and metabolism. Plant tissue culture systems in *Musa* are one of the tools to get plantlets free of pathogens, mass propagation of selected material and germplasm conservation. Contributions on somaclonal variation, anthers culture, protoplasts, genetic engineering and molecular studies are helping programmers of conventional breeding. The aspiration to create new cultivars of *Musa* gives to the farmers better conditions in order to increase the bananas and plantains production. The results presented in this work is one of the progress we obtained in our research.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de bananos y plátanos es una importante actividad agrícola y se considera como prioritaria para la prosperidad de pequeños, medianos y grandes agricultores.

Dentro de los países productores de bananos y plátanos, Colombia se destaca por ser el tercer país en exportación de banano. De la misma manera, el plátano representa el producto básico en la dieta alimentaria del pueblo colombiano.

La importancia de mejorar la calidad de la fruta en los países tropicales y subtropicales responde a dos necesidades fundamentales: alimentar a la población e incrementar la rentabilidad de los cultivos con fines de exportación.

El propósito de lograr una producción rentable y permanente de estas especies radica en el establecimiento de cultivos de alta calidad que presenten la sanidad requerida para la certificación del material.

A pesar de los obstáculos que presentan los cultivos de bananos y plátanos como es la incidencia de enfermedades de origen fungoso, viral bacterial y el ataque de algunos nemátodos y plagas, los avances en las investigaciones de cada uno de estos tópicos han permitido solucionar algunos de estos problemas (Perea, 2003).

[1]Profesora titular, Universidad Nacional de Colombia; E - mail: emperead@unal.edu.co

En efecto, los logros obtenidos mediante el empleo de tecnologías modernas que comprenden los sistemas "*in vitro*" y la manipulación genética los que se complementan con las técnicas convencionales de selección para el hallazgo de clones de interés en la agricultura.

EVALUACIÓN SANITARIA

Las pérdidas en la producción de bananos y plátanos, la mayoría causadas por microorganismos, nemátodos y plagas han generado numerosos problemas debido a los altos costos en el control de enfermedades, además de los cambios inherentes con el medio ambiente los cuáles repercuten en la salud humana y animal.

En lo concerniente al proceso de limpieza de las plantas infectadas por virus y viroides, el cultivo de meristemos ha sido utilizado por más de tres décadas y es considerado como alternativa para la eliminación de estos patógenos.

La importancia de certificar las plantas obtenidas por cultivo de meristemos radica en la disponibilidad de ofrecer al agricultor plantas sanas para el establecimiento o renovación de cultivos comerciales.

El cultivo de meristemos (Figura 1) no necesariamente es sinónimo de material libre de virus como muchos técnicos lo consideran; por lo cual se hace necesario la indexación de las plantas.

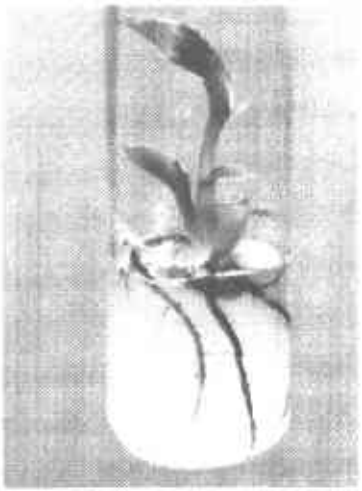

Figura 1. Regeneración de plántulas a partir del cultivo de meristemos (*Musa* spp)

Hace algún tiempo, el virus del mosaico del pepino cohombro (CMV) se consideró oportunamente una preocupación, sin embargo, estudios relacionados con el virus del rayado del banano (BSV) indican que es potencialmente más nocivo. Igualmente el virus del Bunchy Top (BBTV) en Asia es de considerable interés. Drew y colaboradores (1989), demostraron que puede ser transmitido a través del cultivo de meristemos.

Los procedimientos de termoterapia, quimioterapia y crioterapia en combinación con el cultivo de meristemos son recomendados para la obtención de plantas certificadas.

Indudablemente se necesitarán nuevas estrategias para su eliminación y se puede predecir que de tiempo en tiempo aparecerán nuevos patógenos que tendrán que ser estudiados.

SISTEMAS DE PROPAGACIÓN CLONAL

El énfasis en la importancia de la propagación clonal para la producción de materiales mejorados por cualquier sistema, permite el desarrollo de una agricultura sostenible que integrada a la sanidad y al mejoramiento de los cultivos se logra obtener un gran número de plantas en un tiempo relativamente corto.

Los sistemas de propagación clonal son considerados como uno de los aspectos prácticos más avanzados y de aplicación práctica para la producción de semilla asexual certificada.

Las metodologías establecidas para la propagación en bananos y plátanos han sido extensamente estudiadas en los últimos años, actualmente se dispone de tecnologías para la propagación de genotipos diferentes en Musáceas. (De Guzmán *et al.*, 1976; Vesser y Rivera 1981; Cronauer y Krikorian 1985; Banerjee y De Langhe 1985, Jarret *et al.*, 1985; Novak *et al.*, 1986 y Wong, 1986).

De manera exitosa Cronauer y Krikorian 1985 a,b, desarrollaron por primera vez la propagación clonal utilizando el meristemo floral de *Musa* sp, y lograron establecer un sistema multiplicador de yemas vegetativas.

Es así como algunos investigadores han desarrollado varios sistemas de propagación en bananos y plátanos los cuales se utilizan con éxito en los laboratorios de biotecnología: proliferación de brotes (Figura 2), sistemas de Inmersión temporal, embriogénesis somática y semillas artificiales (Perea, 2003).

VARIACIONES GENÉTICAS

Figura 2: Propagación clonal formación de brotes múltiples (*Musa* spp.)

Las variaciones genéticas espontáneas han desempeñado un papel importante durante la evolución y aclimatación de los bananos y plátanos. Sin embargo, la baja tasa de variación genética y la esterilidad, constituyen un obstáculo para la obtención de clones promisorios.

Los cambios genéticos y cromosómicos ocurren a medida que el cultivo de células y tejidos en condiciones *in vitro* continúa con los ciclos de diferenciación y rediferenciación, estos cambios son conocidos como variación somaclonal (Perea, 2003).

En el transcurso de los años, los reportes sobre la micropropagación y producción *in vitro* derivados de clones de bananos y plátanos obtenidos por propágulos de origen poco conocido ha sido ampliamente discutida.

El interés de la variación somaclonal para Musáceas es alto y existen algunos reportes como es el caso del Giant Cavendish (AAA) que presenta 2.4% de variación y con características de enanismo, hojas angostas, y resistencia a *Fusarium oxysporum, Fusarium cubense*, raza 4. El banano Grande naine con 5.25% de variación se caracteriza por presentar bajo porte, hojas angostas, pseudo tallo delgado, racimos pequeños con dedos cortos.

Las modificaciones encontradas en plátanos se relacionan con el clon Dominico hartón con una alta frecuencia de variación que llega al 21% y presenta reversión como característica sobresaliente (Vuylsteke *et al.*, 1988).

El plátano falso cuerno (Bise egone 2) presenta la más alta frecuencia de variación que llega casi a 70% y también con características de reversión.

Muchas de las variantes somaclonales se mantienen estables y podrían ser la base del mejoramiento en programas específicos susceptibles de ser explotadas.

MUTACIONES INDUCIDAS

La inducción de mutaciones con fines de mejoramiento radica en la alteración de una o varias características de un cultivar, conservando el genotipo original. El caso de *Musa* ha sido de particular interés por considerarse este género únicamente de reproducción vegetativa.

El empleo de la fitotecnia por mutaciones fue establecido por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y se utiliza en diferentes países de Europa, América Latina, Asia y África.

Los trabajos de Novak (1986), demostraron que las diferencias en los procesos de radiosensitividad dependen del nivel de ploidía y de la constitución en los híbridos de los genomas A y B. Por ejemplo el clon diploide Sh-3142 (AA) demostró mayor sensibilidad a las radiaciones gamma, mientras que el clon tetraploide Sh-3436 (AAAA) expreso un bajo nivel de sensibilidad con estos mismos tratamientos.

Los estudios de Roux (1997), permiten concluir que las diferentes accesiones de Musa generan sus respuestas dependiendo del nivel de ploidía, sin embargo la estructura multicelular de los meristemos que conduce al quimerismo es un impedimento. Además, el azar en el proceso de inducción de mutaciones requiere la revisión de varios miles de plantas después del tratamiento. Recientemente ha sido posible superar estas dos barreras a través de tratamientos mutagénicos de suspensiones celulares embriogénicas y el establecimiento de un método de selección precoz, que consiste en la infiltración del juglone, este compuesto es un metabolito tóxico del hongo *Mycosphaerella fijiensis (Fiura 3).* Al revisar 4000 plantas durante este proceso se observaron 15 mutantes los cuales demostraron tolerancia a este metabolito.

PRODUCCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES

El empleo de haploides en el mejoramiento de interés en los cultivos comerciales permite la obtención de plantas homocigotas sin pasar por el proceso de endogamia.

La mayoría de los haploides duplicados producen progenies homogéneas y son recomendadas para establecer líneas estables.

El cultivo de anteras ha sido ampliamente estudiado, especialmente en cereales y otras especies de importancia económica como el café, caucho y cacao.

En el caso de *Musa*, Kerbellec (1996), desarrolló el proceso de androgénesis utilizando anteras del clon *Musa acuminata* sp. burmanica tipo Long Tavoy observando la formación de callo a nivel de la dehiscencia de la antera y después de dos semanas de cultivo se observó la formación de los brotes que luego generaron la formación de plántulas.

Las plantas se llevaron a invernadero y durante la evaluación se observaron las plantas diploides concluyendo que la duplicación de cromosomas se presentaba espontáneamente.

Perea (1997,1998), desarrollaron metodologías para la obtención de haploides en *Musa*. Los estudios de viabilidad y germinación del polen y los niveles de ploidía se realizaron en nueve clones AA y BB. Entres de los clones diploides estudiados se obtuvo la embriogénesis somática directa*: Malacensis phagang*, Tani y *Pisan lillin* utilizando como auxina el 2,4-D y Kinetina como citoquinina (Figura 4).

Recientemente Asan *et al.* (2003), establecieron el protocolo para la producción de plantas haploides a partir del cultivo de anteras utilizando clones de Musa balbisiana (BB).

Para la determinación del nivel de ploidía se utilizó el análisis de citometría en flujo y se verificó la haploidía de las plantas del genoma BB; estos resultados pueden ser utilizados para los programas de mejoramiento en bananos y plátanos.

LOS PROTOPLASTOS EN EL MEJORAMIENTO DE MUSÁCEAS

La importancia de los protoplastos en el mejoramiento de bananos y plátanos representa una invaluable herramienta de estudio en la obtención de híbridos y la manipulación genética.

Los primeros trabajos en el aislamiento de protoplastos en *Musa* han sido realizados por Bakry (1984) quien a partir de callos de inflorescencias logró obtener protoplastos, luego Krikorian (1988) utilizando semillas inmaduras de *Musa ornata* y más tarde Rossignol con suspensiones celulares de *Musa acuminata* "Long Tavoy".

Figura 4. Formación de estructuras lobulares en cultivo de anteras del clon *Tani* (BB)

Figura 3. Evaluación del clon Grande Niame después de Co 60

En 1986, Novak y colaboradores estandarizaron los protocolos para el aislamiento y cultivo de protoplastos tomando como explante, segmentos de hoja y cormo. Igualmente Khatri (1991), reportó el aislamiento de protoplastos a partir del rizoma de plantas *in vitro*.

Megia *et al.* (1993), logró la regeneración de plántulas a partir de protoplastos aislados del clon Beeggloe (AAB), por la misma época Panis *et al.* (1993), aisló y purificó protoplastos a partir de células embriogénicas.

En Brasil, Matsumoto y Olea (1998), aislaron protoplastos y obtuvieron plantas del clon Maça (AAB) utilizando "scalps".

Todos estos avances facilitan la hibridación somática en un tiempo relativamente corto y soluciona algunos obstáculos como los cruces imposibles de realizar por la vía sexual. En consecuencia, el acceso a las manipulaciones de estas estructuras podrían ser un complemento en los programas de hibridación clásica.

MANIPULACIONES GENÉTICAS

La aplicación de los métodos clásicos en las últimas cinco décadas orientados a mejorar la resistencia de enfermedades en la mayoría de los bananos cultivados ha demostrado limitados éxitos debido al tiempo prolongado de generación de las plantas, a la triploidía y alta esterilidad.

Los estudios de transformación han permitido contribuir al desarrollo del mejoramiento y a una mejor comprensión de los mecanismos básicos comprometidos en la regulación de genes en las plantas.

Los primeros reportes para transformar plantas de *Musa* (*Musa* spp. cv. Bluggoe) se encuentran en los trabajos de Sagi *et al.* (1994), quienes utilizaron el sistema de electroporación para la expresión **cccccc** del ADN en protoplastos provenientes de suspensiones celulares embriogénicas. El mismo autor desarrollo el protocolo para la transformación de banano utilizando genes foráneos gusA codificado para ß-glucosamidasa (GHS) como gen reportero. Las células bombardeadas con partículas de Tungsteno se seleccionaron, con higromicina y se obtuvo la regeneración de plantas.

May *et al.* (1995), desarrollaron un novedoso sistema de transformación en banano (Grande Naine) mediante la introducción del gen de *Agrobacterium tumefaciens* como agente del gen mpt-II usando la karramicina.

Posteriormente, Swennen et al (1998), desarrollaron los cultivos transgénicos de banano cavendish cv. Williams, introduciendo el gen foráneo Ace-AMP y Becker (2000), establecieron el método efectivo para la transformación genética y regeneración del banano Grande Naine, utilizando el bombardeo de partículas para controlar el virus del Bunchy Top (BBTV).

En síntesis, los avances logrados por diferentes investigadores a través de los sistemas *in vitro* y la biotecnología en algunos clones de *Musa*, son considerados como un complemento para que en los próximos años, el agricultor pueda disponer de plantas mejoradas y obtener una mejor producción de la fruta.

BIBLIOGRAFÍA

ASAN. A. ET AL. 2003. Production of Haploide from Anther Culture of Banana *Musa balbisiana* (BB). *In:* Cell Biology and Morphogenesis. 21: 511-516.

BAKRY, F & L. ROSSIGNOL. 1984. Development de Pousses Vetatives a Partir de la Culture in vitro d'explants inflorescіels de bananies *(Musa)* *In:* Fruits Vol. 4, Nº 7 y 8: 459-465.

BANERJEE, C. AND E.A. DE LANGHE. 1985. A Tissues Culture Technique for Rapid Clonal Propagation and Storage Under Minimal Growth Conditions of *Musa* (Banana and Plantain). *In:* Plant Cell Reports. 6: 351-354.

CRONAUER, S.S. & A.D. KRIKORIAN. 1985. Reinitiation of Vegetative Growth from Aseptically Culture Terminal Floral apex of Banana. In: American Journal of Botany. Vol. 72 Nº 10 pp.1598-1601.

CRONAUER, S.S. Y A.D. KRIKORIAN. 1985. Aseptic Multiplication of Banana from Excised Floral Apices. *In*: Hortscience Vol. 20, Nº 4; 770-771.

KATRY, A. 1991. Implications of *Musa* sp. propagation techniques including mutations inductions. Plant Cell 42:39-48.

KRIKORIAN A.D. ET AL. 1988. Protoplast Culture of Peremnials. *In*: Scientia Horticulturae. Vol 37, Nº 3:277-293.

MEGIA, R; R. HAICOUS;L. ROSSIGNOL & D. SIHACHAKR. 1992. Callus Formation from Culture Protoplasts of Banana (*Musa* spp). Plant Sci. 85:91-98.

NOVAK, F.J.; R, AFZA & M. VAN DUREN. 1989. Mutagénesis *in vitro* para el mejoramiento genético del banano y del plátano Musa spp. UPEB, Informe mensual 88-89; pp. 61-80 Panamá.

NOVAK, F.J.; R, AFZA; M. VAN DUREN & M.S. OMAR. 1990. Mutation Induction by Gamma Irradiation of *in vitro* Cultured Shoot-tips of Banana and Platain (*Musa* cvs). Tropical Agriculture (Trinidad) 67:21-28.

NOVAK, F.J.ET AL. 1986. Potencial of Banana and Plantain Improvement Through *in vitro* Mutation Breeding. P. 67-70 En: Galindo, J & R. Jaramillo. *En:* Memorias Reunión ACORBAT (7: San José C.R.) Turrialba: CATIE, 1987. 504p.

PANIS, B.I.; VAN HOWVE & R. SWENNEN. 1993. Plant Rgeneration Through Direct et Somatic Embryogenesi from Protoplasts of Banana *Musa* spp. Plant Cell. Rep. 12: 403-407.

PEREA DALLOS, M. 2003. Biotecnología de Bananos y Plátanos. Ministerio de Agricultura. Universidad Nacional de Plant regeneration through direct et somatic embryogenesi from protoplasts of banana Musa spp. Plant Cell. Rep. 12: 403-407.

PEREA DALLOS, M. 2003. *Biotecnología de Bananos y Plátanos.* Ministerio de Agricultura. Universidad Nacional de Colombia. 228 p. Editora Guadalupe. Bogotá.

ROUX, N.S.; A. TOLOZA, J.P.BUSOROGO; B. PANIS; H. STROSE; P. LEPROIVE, R.SWENNEN & F.J. ZAPATA-ARIAS. 1997. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to Mycosphaerella Leaf Spot diseases on *Musa*. Procedings of Second International Worshop of Mycosphaerella Leaf Spot diseases of banana. p. 1-10. San Jose-Costa Rica, 20-23 mayo 2002.

SMITH, M.K. & DREW R.A. 1990. Current Aplications of Tissue Culture in Plant Propagation and Improvement. Aust. J. Plant Physiol. 17:267-289.

VESSEY, J.C & J.A. RIVERA. 1981. Meristem Culture of Banana. *In:* Turrialba. Vol 31 Nº 2 pp. 161-163.

VULYLSTEKE, D & E.A. DE LANGHE. 1985. Feasibility of *in vitro* Propagation of Banana and Plantain. *In:* Tropical Agriculture. Vol. 62 Nº 4: 323-328.