

Embriogénesis somática en *Musa AAAB*, cv. FHIA-18 empleando medios de cultivo líquidos

L. Barranco^{1*}, R. Gómez², M. Reyes², B. Chong² *Autor para correspondencia

¹ Lab. de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario Las Tunas. Ave Carlos J. Finlay. Las Tunas. Cuba. e-mail: lbolivera2@yahoo.es

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km.5.5. Santa Clara. Cuba.

RESUMEN

Los resultados demostraron que es posible el establecimiento de suspensiones celulares homogéneas a partir de embriones somáticos en etapa globular y obtener los mayores volúmenes de biomasa celular, al multiplicar dichas suspensiones con una densidad del 3.0% del VCS. A partir del decimoquinto día en el medio de cultivo de formación de embriones comenzaron a formarse estructuras compuestas por proembriones y embriones somáticos en etapa globular, entre las densidades estudiadas los mejores resultados se obtuvieron con 100 mgMF en la cual se formaron 1 871 ES.l⁻¹ con un peso de 248 mgMF.l⁻¹. Con una densidad inicial de 0.6 gMF en el medio de cultivo para la multiplicación secundaria, se logró un incremento de 42.9 veces la cantidad inicial de masa fresca; después de 60 días de cultivo se lograron 15 985 ES.l⁻¹. Los mayores porcentajes de maduración se obtuvieron con 400 mgMF con 70% de embriones somáticos maduros. Se pudo comprobar el efecto positivo del *Biobras-6*, con una concentración de 0.01 mg.l⁻¹ se obtuvo los mayores porcentajes de germinación en el medio de cultivo líquido. La mejor densidad en los RITA fue de 0.5 gMF con 85% de germinación. Las plantas obtenidas de embriones somáticos fueron llevadas al ambiente *ex vitro*, junto a plantas provenientes de la micropropagación convencional para realizar estudios sobre la posible presencia de variabilidad somaclonal. Durante el 1^{er} ciclo las plantas provenientes del cultivo *in vitro* mostraron diferencias con respecto a las de semilla asexual en cuanto a la altura, diámetro y número de hijos. En el 2^{do} ciclo de producción las plantas de embriones somáticos mostraron características similares a las plantas provenientes de yemas axilares y semilla asexual, en cuanto a los parámetros morfológicos evaluados, encontrándose solo un 0.2% de plantas con cambios fenotípicos.

Palabras clave: Bananos, densidad celular, embriones somáticos, germinación, variabilidad somaclonal.

ABSTRACT

Homogenous cell suspensions were initiated from somatic embryos in the globular stage and the greatest volume of cell biomass on multiplying the suspensions at a density of 3.0% PCV. From the fifteenth day in culture medium for the formation of embryos, structures consisting of proembryos and somatic embryos in the globular stage started to form. With respect to the densities studied, the best results were obtained with 100 mgFW, where 1 871 SE.l⁻¹ formed with a weight of 248 mgFW.l⁻¹ after 30 days. With an initial density of 0.6 gFW in the culture medium for secondary multiplication, an increase of 42.9-fold the initial amount of fresh weight was obtained; after 60 days of culture 15 985 SE.l⁻¹ were obtained. The greatest percentage of maturation was obtained with 400 mgFW with 70% of mature somatic embryos. The positive effect of *Biobras-6* (brassinosteroid analogous) was confirmed, with a concentration of 0.01 mg.l⁻¹ the best germination percentages were obtained in liquid and semisolid culture medium. Embryo germination in temporary immersion (RITA) was achieved with an inoculum density of 0.5 gFW for system with 85% germination. One thousand plants obtained from somatic embryos were taken to *ex vitro* environment, along with plants derived from conventional micropropagation (shoot tips) to carry out studies on the possible presence of somaclonal variation. During the first cycle of production, the plants derived from the two methods *in vitro* culture showed differences with respect to the plants derived from corms in height, diameter and number of suckers. In the second production cycle, the plants from somatic embryos showed similar characteristics to the plants derived from shoot tip and corms with respect to the morphological parameters evaluated, with only 0.2% of the plants with phenotypic changes.

Key Words: Banana, cellular density, germination, somaclonal variability, somatic embryo

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) constituyen una importante fuente de alimentación a nivel mundial. En la actualidad, la propagación de plantas *in vitro* a escala comercial se ha

consolidado mundialmente, y la regeneración vía organogénesis a partir de ápices se mantiene como el método más utilizado en este cultivo, lo que se debe principalmente a la posibilidad de multiplicar plantas libres de patógenos con una adecuada estabilidad genética (Orellana, 1998).

Sin embargo, esta vía de regeneración presenta algunas limitantes importantes, como son la necesidad de ejecutar un elevado número de operaciones manuales y los bajos coeficientes de multiplicación que aún se obtienen, esto repercute directamente en el aumento de los costos de producción.

Estas dificultades pudieran atenuarse si se tienen en cuenta las posibilidades que ofrece la embriogénesis somática. Esta vía de regeneración permite obtener volúmenes de producción superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual la convierte en un método potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Thorpe, 1991). No obstante, su empleo para la propagación comercial aún es escaso. Una posible explicación de este fenómeno a nivel mundial esta relacionada, en primer lugar, con el desconocimiento que existe sobre la biología del proceso, unido a la no disponibilidad de sistemas eficientes y repetibles de regeneración.

La obtención de un sistema de regeneración eficiente por medio de la embriogénesis somática puede responder a dos objetivos, tener una técnica competitiva para la multiplicación masiva y un sistema para el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética (Merkle *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó el presente trabajo con el objetivo de desarrollar una metodología de embriogénesis somática en medios de cultivo líquidos a partir de inflorescencias masculinas inmaduras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se usaron brotes inmaduros de la inflorescencia masculina (pámpanas) de *Musa* AAAB, cv. FHIA-18. Las pámpanas se colectaron en el banco de variedades de la Empresa de Cultivos Varios "La Cuba", posteriormente bajo un microscopio estereoscópico se extrajeron los 14 fascículos nodales más cercanos al meristemo floral y se colocaron desde el fascículo cinco hasta el doce, en frascos de cultivo con el medio para la formación de los callos propuesto por Escalant *et al.* (1994).

El establecimiento de las suspensiones celulares fue a partir de embriones somáticos obtenidos de callos con embriogénesis somática de alta frecuencia proveniente de flores masculinas inmaduras. Se evaluó la influencia de la densidad celular en la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares y se determinó un valor mínimo de inóculo que permitiera una correcta multiplicación de las suspensiones celulares.

Se estudiaron diferentes densidades de inoculación para las etapas de formación, multiplicación y maduración de los embriones somáticos. Se evaluaron las concentraciones de un análogo de brasinoesteroide (*Biobras-6*), obtenido por el Centro de Productos Naturales de la Universidad de La Habana, como promotor de la germinación *in vitro* en medio de cultivo líquido, así como el efecto de la densidad de inóculo en sistemas de inmersión temporal.

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de las plantas obtenidas de embriones somáticos, se transfirieron 1 000 plantas al ambiente *ex vitro*, con una altura entre 4.0 y 5.0 cm y con tres o cuatro hojas activas.

Esta fase se desarrolló según la metodología propuesta por Pérez *et al.* (1999) en una casa de cultivo. En esta fase se evaluaron a los 50 días en cada una de las poblaciones 100 plantas al azar a las cuales se les realizaron las siguientes evaluaciones:

- Altura (cm) de la planta.
- Ancho (cm) de la penúltima hoja emitida.
- Largo (cm) de la penúltima hoja emitida.
- Largo (cm) del pecíolo de la penúltima hoja emitida.
- Distancia (cm) entre la hoja dos y tres.
- Caracteres cualitativos tales como: color del pseudotallo y del limbo.
- Porcentaje de supervivencia (Total de la población).
- Con el fin de estudiar la variabilidad fenotípica que se produjo en esta vía de regeneración de plantas, se plantaron en el campo 1 000 plantas procedentes de tres vías de propagación.
- Plantas obtenidas de la germinación de embriones somáticos.
- Plantas regeneradas vía organogénesis (Micropropagación).
- Plantas procedentes de semillas asexuales (Cormos).

Se procedió a evaluar toda la población para caracterizar la frecuencia de variantes totales (%) y luego dentro de ella se realizó un muestreo de 50 individuos, repartidos aleatoriamente, por cada grupo de planta analizado, con el fin de estudiar aspectos fenotípicos, según metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997). Se evaluaron dos ciclos de producción de las plantas.

Para el procesamiento de los datos se emplearon los siguientes paquetes estadísticos: *SPSS* ver. 9.0, *STATISTIX* ver. 1.0 y *CURVE EXPERT* ver. 1.3 para "Windows".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 45 días de cultivo de las suspensiones celulares establecidas, se observó que los agregados embriogénicos llegaron a ocupar entre

90-95% de la suspensión y su tamaño varió entre 80-300 μm , formándose una suspensión celular homogénea. La densidad del 3.0% de volumen de células sedimentadas (VCS) mostró una fase de crecimiento exponencial bien definida y continua.

En esta densidad se produjo el mayor incremento de la biomasa celular con 0.35 ml de VCS, siendo este el valor mínimo que permite una correcta multiplicación de las suspensiones celulares (Fig. 1).

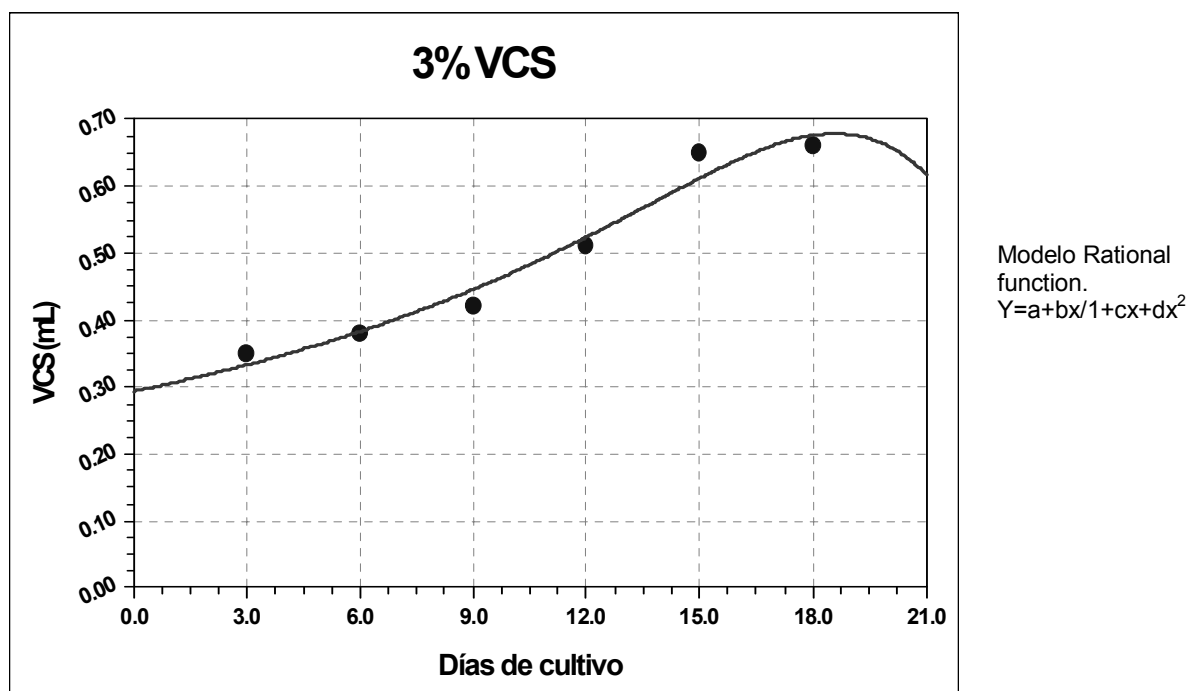


Figura 1. Influencia de la densidad celular en la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares de FHIA-18 en el tiempo.

Al analizar los resultados de las diferentes densidades de células estudiadas, para la formación del número de embriones somáticos (ES) en el medio de cultivo líquido, se obtuvieron diferencias estadísticas entre todos los tratamientos.

Los mejores resultados se lograron con la densidad de 100 mgMF con 704 ± 6.71 y $1\ 871 \pm 9.32$ ES. l^{-1} obteniéndose estos en etapa globular después de 15 y 30 días de cultivo respectivamente (Fig. 2). En años recientes, algunos autores han hecho referencia al papel de la densidad de inoculación y su relación con el proceso de diferenciación, utilizando como cultivo modelo *Daucus carota*. Shigeta *et al.* (1996), señala la mayor formación de embriones somáticos en medio de cultivo en agitación con densidades bajas 0.5 ml del VCS para este cultivo y Freire (2001) en caña de azúcar obtuvo 190.3 ES. l^{-1} con el 10% del VCS.

Con la densidad 0.6 gMF en 25 ml de medio de cultivo para la multiplicación se lograron los mejores resultados, lo cual resultó en un incremento de 42.9 veces en la cantidad de masa fresca después de 60 días de cultivo y donde además se logró el mayor número de embriones totales con $15\ 985 \pm 45.8$ ES. l^{-1} .

En el experimento donde se empleó medio de cultivo líquido en agitación para la maduración, fue posible lograr la misma en dos de las densidades iniciales estudiadas. En la densidad de 800 mgMF se observó una rápida maduración de los embriones somáticos la cual ocurrió en solo 15 días, con un 30% de embriones maduros. Sin embargo con la densidad de 400 mgMF se apreció una mayor sincronización, pero en cuanto al tiempo, demoró más (22 días) con un porcentaje de 70%. Con densidades menores a 400 mgMF los embriones somáticos no maduraron sino que se multiplicaron.

La densidad de inóculo para el cultivo de embriones somáticos varía para cada especie en particular, pero se demostró que es una de las variables de cultivo que define el comportamiento de la embriogénesis somática, independientemente en muchos casos de la fase de desarrollo y la composición del medio de cultivo, pues generalmente ocurre que cuando se utilizan densidades de inoculación bajas se estimula el proceso de diferenciación de los agregados celulares y por consiguiente la formación y diferenciación de los embriones somáticos, mientras que al emplear altas densidades de inoculación se favorecen las condiciones para la multiplicación de los embriones somáticos.

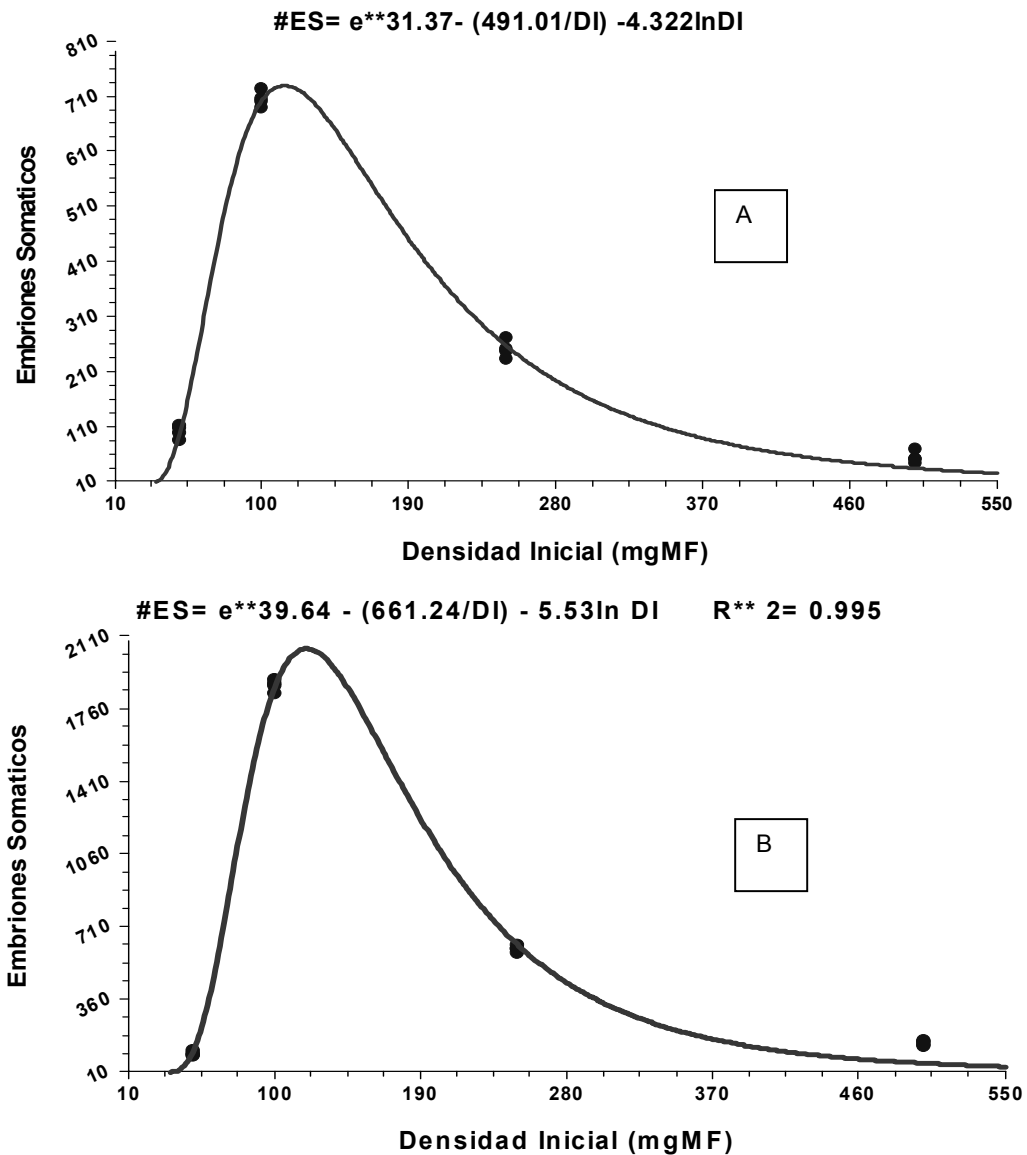


Figura 2. Efecto de la densidad de inoculación en el número de embriones somáticos de FHIA-18 por litro de medio de cultivo: A. 15 días de cultivo y B. 30 días de cultivo.

Los resultados al emplear los sistemas de inmersión temporal mostraron que se obtuvo un mayor porcentaje de germinación de los embriones somáticos del cultivar FHIA-18, cuando se utilizó la concentración de 0.01 mg. l⁻¹ de *Biobras-6*. El número de embriones germinados así como el porcentaje de germinación alcanzado en este

tratamiento fue de 409 embriones somáticos (81.8 %) superando en un 16.9% al tratamiento sin *Biobras-6*. Se obtuvo una mejor respuesta con respecto al número de embriones germinados, en el tratamiento con 0.5 gMF de embriones somáticos, obteniéndose un 85% de germinación (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la densidad de inóculo sobre la germinación de embriones de FHIA-18 en sistemas de inmersión temporal.

| Densidad de inóculo | No. de embriones iniciales | No. de embriones germinados | Germinación (%) |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 0.3 gMF | 300 | 185 | 62b |
| 0.5 gMF | 500 | 425 | 85a |
| 0.7 gMF | 700 | 182 | 26c |
| 1.0 gMF | 1 000 | 170 | 17d |
| Testigo (Semisólido) | 240 | 33 | 14d |

*Letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para p<0.05

A los 50 días de iniciada la fase de aclimatización, al realizar el estudio comparativo de la población se encontraron diferencias estadísticas para la variable altura de la planta, las plantas obtenidas de embriones somáticos fueron 0.77 cm superiores a las obtenidas a través de yemas axilares. En los demás parámetros estudiados no se encontraron diferencias significativas, siendo el porcentaje de supervivencia del 98.5 % en las dos vías de regeneración (Tabla 2).

Las evaluaciones fenológicas después de seis meses en campo, permitieron determinar diferencias fenotípicas entre las plantas procedentes de embriones somáticos, micropropagación y semillas asexuales. La frecuencia total de variación en las 1 000 plantas procedentes de embriones somáticos fue de 1.0% y del 0.50 y 0.10% en las micropropagadas y semilla asexual respectivamente. Este 1.0% fue superior a los controles, pero se considera bajo cuando lo comparamos con los resultados obtenidos por autores como Shchukin *et al.* (1998), en el cv. Gran Enano (AAA) que obtuvo valores entre 1.6-7.9% de variantes somaclonales, siendo

el enanismo y el mosaico las variaciones más frecuentes.

Las variaciones observadas fueron: cambios de tonalidad en la coloración del pseudotallo, enanismo, diferencias de pigmentación de las hojas, dichas variaciones pudieran estar dados por cambios epigenéticos ocurridos por los efectos del cultivo *in vitro per se*. Pues dichos cambios desaparecieron en el segundo ciclo y solo permanecieron dos plantas (0.2%) con crecimiento retardado que si se mantuvieron durante todo el estudio en la población de plantas obtenidas de embriones somáticos; todas las demás variantes no se observaron en el segundo ciclo.

Las plantas provenientes de embriones somáticos mostraron hábitos de crecimiento similares a las plantas obtenidas de las yemas axilares, en cuanto a la altura de la planta, diámetro del pseudotallo y números de hijos; difiriendo significativamente ambos grupos de plantas provenientes del cultivo *in vitro* de las plantas obtenidas de semillas asexuales durante el período de floración de la planta madre (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento en condiciones de campo de plantas de FHIA-18 regeneradas a partir de embriones somáticos a los seis meses de cultivo.

| Tratamientos | Altura de la planta (m) | Diámetro del pseudotallo (cm) | Número de hijos |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Embriogénesis somática. | 2.40 a | 51.38 a | 6.92 a |
| Organogénesis. | 2.43 a | 50.80 a | 6.32 a |
| Semilla asexual. | 1.57 b | 36.28 b | 4.00 b |
| ES | ±0.04 | ±0.97 | ±0.22 |
| CV | 21.63% | 18.01% | 29.3% |

*Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según la comparación múltiple basada en la prueba de Dunnett's C y Duncan para el No. de hijos.

La mayor altura de la planta y el diámetro del pseudotallo es debido al efecto del rejuvenecimiento y saneamiento provocado por el cultivo *in vitro*, siendo esto muy observado en plátanos y bananos (Zamora *et al.*, 1989; Drew y Smith, 1990; Sandoval *et al.*, 1991; Israeli *et al.*, 1991). El rejuvenecimiento *in vitro* se produce al perder el tejido la señal que poseía de la planta madre, esta pérdida es más rápida a medida que el explante sea más pequeño y se den más subcultivos *in vitro*, manifestándose con un aumento en el vigor fisiológico de determinadas variables agronómicas (Pérez, 1998).

Durante el segundo ciclo de evaluación las plantas provenientes de las tres vías de propagación estudiadas en el presente trabajo presentaron hábitos de crecimiento similares entre ellas, sin diferencias estadísticas en la mayoría de los parámetros morfológicos evaluados.

Estos resultados confirman que las diferencias obtenidas durante el primer ciclo entre las distintas poblaciones, se deben a cambios temporales, recuperando luego las características originales del cultivar a partir del segundo ciclo de cultivo.

CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en medios de cultivo líquidos en *Musa* cv. FHIA-18 a partir de inflorescencias masculinas inmaduras, que abarcó desde el establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares homogéneas hasta la plantación y cosecha en campo.

Luego de dos ciclos en campo, las plantas provenientes de embriones somáticos mostraron un comportamiento similar a las plantas obtenidas

por organogénesis y semillas asexuales, obteniéndose un 0.2% de variación fenotípica.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de las Plantas y a la Empresa de Cultivos Varios La Cuba, por brindarnos sus instalaciones para montar los experimentos.

REFERENCIAS

Drew RA y Smith MK (1990) Field evaluation of tissue-cultured bananas in south-eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30:569-574

Escalant JV, Teisson C y Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell Dev. Biol* 30:181-186

Freire M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. C87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis para aspirar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara. 101p.

Israeli Y, Reuveni O y Lahav E (1991) Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Scientia Horticulturae* 48:71-88

Merkle S, Parrott W y Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (Ed) *In Vitro Embryogenesis in plants*, pp. 155-203. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands

Orellana P (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez JN (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 151-178. IBP, Santa Clara

Pérez JN (1998) Variación somaclonal. En: Pérez JN (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 105-121. IBP, Santa Clara

Pérez JN, Agramonte D, Jiménez F, Ramírez D (1999) Informe Final del Proyecto "Desarrollo y perfeccionamiento de la propagación masiva en las fases III y IV, enraizamiento y adaptación en caña de azúcar, papa, plátanos y bananos y adaptación de semillas artificiales en caña de azúcar" IBP, Santa Clara

Sandoval J, Tapia A, Muller L y Villalobos A (1991) Observaciones sobre la variabilidad encontrada en plantas micropropagadas de *Musa* cv. Falso Cuerno (AAB). *Fruits* 46(5):533-539

Sandoval JA, Pérez L y Côte F (1997) Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano). *CORBANA* 22(48):41-60

Shchukin A, Ben-Bassat D y Israeli Y (1998) Somaclonal variation and horticultural performance of Grand Naine bananas multiplied via somatic embryogenesis or shoot-tip culture. Abstracts in IX international congress on plant tissue and cell culture. Jerusalem, Israel

Shigeta J, Sato K y Mii M (1996) Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science* 115:109-114

Villalobos V y Thorpe T (1991) Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca WM y Mroginski LA (Eds) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, pp. 127-141. CIAT, Colombia

Zamora AB, Damasco OP, Estaño ES, Barba RC y Pateña LF (1989) Note: Growth and yield of micropropagated and sucker-derived banana plants (*Musa* spp. cv. Lakatan, Bungulan and Saba). *The Philippine Agriculturist* 72(4):458-465