

Obtención de plantas del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) a partir de líneas celulares embriogénicas

Leyanis García-Águila*, Rafael G. Kosky, Boris Chong, Maritza Reyes, Marisol Freire-Seijo, Yelenys Alvarado-Capó. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54 830. e-mail: leyanis@ibp.co.cu

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo obtener plantas del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) a partir de líneas celulares embriogénicas. Para este estudio se establecieron líneas celulares de callos con estructuras embriogénicas formados de flores masculinas inmaduras. Los resultados mostraron diferencias entre las líneas durante la fase de multiplicación de la suspensión celular embriogénica. Las mismas se manifestaron en el crecimiento celular. La vitalidad de los agregados celulares embriogénicos osciló entre 99.7 y 100% sin diferencias estadísticas entre las líneas estudiadas. Se observó la influencia de la línea celular en la germinación de los embriones somáticos, la línea número dos presentó el mayor número de embriones germinados. Al concluir los experimentos se obtuvieron un total de 8 230 plantas de las líneas celulares estudiadas. Las mismas se adaptaron a condiciones *ex vitro* en casa de cultivo con altos porcentajes de supervivencia y solo se observaron cambios fenotípicos en menos del 1.0 % del total de plantas. Se comprobó que es necesario tener en cuenta el factor línea celular para la obtención de plantas del cultivar híbrido 'FHIA 21' por embriogénesis somática.

Palabras clave: cambios fenotípicos, embriones somáticos, germinación, línea celular

ABSTRACT

This investigation had as objective to obtain plants of plantain hybrid cultivar 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) from embryogenic cell lines. For this study cell lines of callus were established with embryogenic structures formed of immature male flowers. The results showed differences among the lines during the phase of multiplication of the embryogenic cell suspension. The same ones were showed in the cellular growth. The vitality of the embryogenic cluster cells oscillated between 99.7 and 100% without statistic differences among the studied lines. The influence of the cell line was observed in the germination of the somatic embryos, the cell line number two presented the biggest number of germinated embryos. When concluding the experiments a total of 8 230 plants of the studied cell lines were obtained. These cell lines adapted to *ex vitro* conditions at greenhouse with high percentages of survival and some phenotypic changes were observed in less than 1.0% of the total of plants. The necessity of keeping in mind the factor cell line for the obtaining of plants of cultivar hybrid 'FHIA 21' by somatic embryogenesis was proven.

Key words: cell line, germination, phenotypic changes, somatic embryonic

INTRODUCCIÓN

La regeneración de plantas vía organogénica a partir del cultivo de brotes axilares se mantiene como el método de propagación *in vitro* más utilizado en *Musa* spp. Sin embargo, algunos cultivares tetraploides de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) se consideran altamente «recalcitrantes» a la multiplicación *in vitro*, por el bajo coeficiente de multiplicación y crecimiento de brotes en forma de rosetas (García *et al.*, 2002). El cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) ha ganado importancia en Cuba y en varios países de América Latina debido a sus características agronómicas y organolépticas. Por ello se ha considerado evaluar el uso de la embriogénesis somática en la propagación masiva de plantas de este híbrido.

El conocimiento técnico para la producción de un ilimitado número de embriones somáticos con tamaño y forma uniformes y que den lugar a plantas estables genéticamente todavía no se ha alcanzado en muchas de las especies en las que se ha informado de la aplicación de este método (Gómez *et al.*, 1999).

Además, el empleo de la embriogénesis somática para la propagación masiva de plantas se ve limitado por diferentes factores. Por ejemplo, se requiere evaluar la influencia del material vegetal inicial a partir del cual se desarrolla el proceso de embriogénesis somática ya que su respuesta al cultivo *in vitro* puede no ser homogénea y esto puede provocar diferencias entre las líneas celulares (Bieberach, 1995) que afecte la secuencia de procedimientos que deben llevarse a cabo en un proceso productivo y su planificación.

En 'FHIA-21', Daniels *et al.* (2002) propusieron un sistema de regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática como base para la transformación genética. Sin embargo, no consideraron aspectos importantes que deben ser tenidos en cuenta para emplear este método para la propagación masiva de plantas como los mencionados anteriormente.

Es por ello, que este trabajo tuvo como objetivo establecer líneas celulares embriogénicas del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) y obtener plantas a partir de ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los callos con estructuras embriogénicas se formaron a partir de flores masculinas inmaduras que se colocaron sobre el medio de cultivo semisólido propuesto por Escalant *et al.* (1994) y se incubaron en condiciones de oscuridad y temperatura de 27 ± 2 °C.

A partir de cada callo se estableció una suspensión celular embriogénica la cual se multiplicó e incrementó la cantidad de agregados celulares embriogénicos en el medio de cultivo líquido propuesto por Daniels *et al.* (2002). Cada una se nombró como línea y se le asignó un número. Las mismas se mantuvieron durante todo el proceso de embriogénesis somática.

Para la evaluación del crecimiento celular y la vitalidad de los agregados celulares embriogénicos en cada una de las líneas celulares durante la fase de multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas, cada suspensión celular se inició a partir de 1 ml de células sedimentadas en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad. Cada cinco días y durante 30 días de cultivo se determinó el crecimiento celular por el método de volumen de células sedimentadas (VCS) descrito por Schoofs (1997). Simultáneamente se observó al microscópico óptico (AXIOSKOP) la vitalidad celular con el uso de diacetato de fluoresceína (DAF) (Widholm, 1972).

Los embriones somáticos fueron obtenidos de los agregados celulares embriogénicos cuando estos se colocaron en un medio de cultivo semisólido propuesto por Dhed' *et al.* (1991). Posteriormente, los embriones somáticos se colocaron en los medios de cultivo semisólidos para la maduración y la germinación, propuestos por Gómez *et al.* (2000).

Además, se evaluó la germinación de los embriones somáticos por cada línea celular (germinación tipo I y germinación tipo II, según Escalant *et al.*, 1994) a los 15 días de cultivo en cámara de crecimiento con luz artificial, fotoperíodo de 16 horas luz y densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $62-68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Los embriones somáticos germinados fueron transferidos a un medio de cultivo compuesto por las sales MS (100%) (Murashige y Skoog, 1962) y sin reguladores del crecimiento donde continuaron su crecimiento y desarrollo fisiológico durante 25 días. Posteriormente se transfirieron a casa de cultivo con 70% de intensidad luminosa. El riego se aplicó por microaspersión con frecuencia de seis al día y duración de dos minutos cada uno. Se utilizaron bandejas de polieturano con 70 orificios y sustrato compuesto por una mezcla de casting y zeolita (3:1). A los 10 días de la siembra se determinó la supervivencia de las plantas. Además, se realizaron observaciones a los 45 días, con el objetivo de detectar la presencia de los principales y más frecuentes cambios fenotípicos descritos por Sandoval *et al.* (1997) en *Musa*. Se utilizó como control una población de plantas obtenidas a partir del cultivo de brotes axilares (organogénesis) de acuerdo con el protocolo establecido para ello (IBP, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se establecieron seis líneas celulares embriogénicas a partir de callos formados de flores masculinas inmaduras de 'FHIA 21'. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares en todos los tiempos de evaluación durante la fase de multiplicación con respecto a su crecimiento celular. Se observó que la línea número dos presentó el mayor volumen de células sedimentadas después de 10 y 15 días de cultivo (Tabla 1). Posteriormente no difirió de la línea 3 (20, 25 y 30 días), ni de la 1 y la 4 a los 30 días (Tabla 1).

Las mejores líneas celulares por la mayor multiplicación de los agregados embriogénicos correspondieron a las número 2 y 3, a los 25 días de cultivo. La vitalidad celular de las líneas durante la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas osciló entre 99.7 y 100%, sin diferencias estadísticas significativas entre ellas.

Resultados similares describe Bieberach (1995) quien plantea que la diferencia entre líneas celulares de diferentes cultivares de Musáceas puede estar dada por la no homogeneidad del estado embriogénico del material vegetal inicial utilizado para el establecimiento de las suspensiones.

Gómez *et al.* (1999) durante la multiplicación de SCE del cultivar Gran enano (*Musa* AAA), establecieron tres líneas celulares, las cuales presentaron diferencias en la cantidad de células, agregados embriogénicos y presencia o ausencia de oxidación por fenoles.

Con respecto a la germinación de los embriones somáticos se observó la influencia de la línea celular. El mayor número de embriones germinados con la plúmula clorofílica expuesta se presentó en la línea celular número dos con diferencias estadísticas significativas con el resto de las líneas celulares estudiadas. Sin embargo la presencia de embriones somáticos con germinación completa y formación de plantas no presentó diferencias estadísticas entre las líneas celulares 1, 3 y 4. (Tabla 2).

Un total de 8 230 plantas fueron regeneradas a partir de embriones somáticos de las diferentes líneas celulares evaluadas (Tabla 3). Las plantas presentaron similares características fenotípicas *in vitro* y cumplieron los parámetros de calidad establecidos para la propagación vía organogénica (altura 3-4cm, 2-3 hojas, diámetro del seudotallo 0.3-0.5cm, sistema radical desarrollado y color verde intenso) (IBP, 2005), lo que permitió su siembra en condiciones *ex vitro*, en casa de cultivo.

Tabla 1. Crecimiento celular de diferentes líneas celulares embriogénicas del cultivar híbrido 'FHIA-21' en la fase de multiplicación de suspensiones celulares, medido como volumen de células sedimentadas (ml).

Líneas celulares	Días de cultivo					
	5	10	15	20	25	30
1	1.10 a	1.35 b	1.42 c	1.60 c	1.87 b	1.95 a
2	1.22 a	1.55 a	1.82 a	2.12 a	2.32 a	2.32 a
3	1.15 a	1.40 b	1.60 b	2.00 a	2.12 a	2.12 a
4	1.15 a	1.35 b	1.55 b	1.85 b	1.97 b	2.00 a
5	1.05 b	1.20 c	1.37 c	1.75 b	1.87 b	1.90 b
6	1.02 b	1.15 c	1.25 d	1.45 d	1.72 c	1.87 b

Medias con letras distintas en una columna difieren estadísticamente según prueba no paramétrica Dunnett C para $p < 0.05$.

Tabla 2. Número de embriones germinados en cuatro líneas celulares del cultivar híbrido 'FHIA 21' a los 15 días de cultivo.

Línea celular	No. de ES	
	Germinación tipo I	Germinación tipo II
1	9.75 d	0.10 b
2	33.75 a	2.75 a
3	15.15 c	1.15 a
4	20.10 b	1.65 a
EE	± 2.15	± 0.3

Medias con letras distintas en una columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según Dunnett C. No. de ES: Número de embriones somáticos. EE: error estándar

Tabla 3. Número de plantas regeneradas a partir de líneas celulares embriogénicas del cultivar híbrido 'FHIA 21'.

Línea celular	Número de plantas
1	455
2	4 625
3	1 520
4	1 630

Las plantas en casa de cultivo mostraron rápida adaptación y recuperación al estrés ocasionado por el cambio de condiciones de cultivo. Tanto en las plantas regeneradas por embriogénesis somática como las utilizadas como control (propagadas vía organogénesis) se alcanzaron altos porcentajes de supervivencia (98.2 y 98.8%) sin diferencias estadísticas y su crecimiento se produjo de manera simultánea y homogénea. Los porcentajes de plantas con cambios fenotípicos fueron inferiores al 1.0%. Se observaron tres tipos de cambios fenotípicos en las plantas obtenidas por ambos sistemas de regeneración. Estos fueron:

- Plantas con cambio en la coloración de las hojas y nerviaciones (Variegadas).
- Plantas con cambio en la textura de las hojas.
- Plantas con cambio en la disposición de las hojas (Abanico).

Después de 60 días de cultivo, las plantas fueron llevadas a campo para evaluar durante dos ciclos el desempeño agronómico y la posible existencia de cambios fenotípicos estables.

Mediante este estudio se comprobó que es necesario tener en cuenta el factor línea celular para la obtención de plantas del cultivar híbrido 'FHIA 21' por embriogénesis somática ya que el origen del material vegetal influyó en el crecimiento celular en la fase de multiplicación de las suspensiones celulares y en el número de embriones somáticos germinados por línea. Los resultados indican además, que el comportamiento diferencial de las líneas celulares durante la propagación vía

embriogénesis somática, no proporciona en este cultivar altos porcentajes de variación somaclonal detectables en condiciones de casa de cultivo.

REFERENCIAS

- Daniels D, Kosky R, Vega M (2002) Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the híbrid cultivar FHIA 21 (*Musa* spp. AAAB). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 38:330-333
- Dhed'a D, Dumortier F, Panis B, Vuylsteke D, De Langhe E (1991) Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46:125-135
- 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
- García L, Pérez B, Sarría Z, Clavero J (2002) Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIA-20. *Infomusa* 11(1):35-38
- IBP (2005) Protocolos para la micropropagación de cultivares de plátanos y bananos mediante organogénesis. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara
- Murashige, T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Schoofs H (1997) The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thesis Ph.D. K.U. Leuven, Belgium. pp. 257
- Widholm J (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of culture plant cells. *Stain Technology* 47:189-194