

## Embriogénesis somática en el cv. Navolean a partir de ápices de brotes de yemas axilares

J. López<sup>1\*</sup>, R. Gómez<sup>2</sup>, A. Rayas<sup>1</sup>, N. Montano<sup>1</sup>, D. Reinaldo<sup>1</sup>, R. Trujillo<sup>3</sup>, M. Cabrera<sup>1</sup>, A. Santos<sup>1</sup>, J. Ventura<sup>1</sup>, V. Medero<sup>1</sup>, M. García<sup>1</sup>, M. Basail<sup>1</sup>, A. Cantero<sup>1</sup> y J. Albert<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Santo. Domingo., Villa Clara, CP 53 000, Cuba. e-mail: jlopez@inivit.co.cu

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), UCLV, Carretera Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, CP 54 830, Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Bioplantas, UNICA, Ciego de Ávila, Cuba.

### RESUMEN

El desarrollo de cultivos embriogénicos en los genotipos AAB de *Musa*, que no poseen inflorescencia masculina persistente, ha tenido mayor éxito a partir de multiyemas para la formación de los callos con estructuras embriogénicas pero esto pudiera incrementar la variación somaclonal. Teniendo en cuenta lo anterior se trabajó en la determinación de otra fuente de explante inicial alternativa para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar objeto de estudio. Se cultivaron brotes axilares en el medio de cultivo P5 suplementado con tidiázuron y ancimidol (0.2; 0.4; 0.6 mg.l<sup>-1</sup> cada uno por separado) para lograr la brotación de yemas axilares. Posteriormente para formar los callos con estructuras embriogénicas se colocaron los ápices de brotes obtenidos de yemas axilares en un medio de cultivo ZZ con diferentes concentraciones de 2,4-D. El mejor regulador del crecimiento para la brotación de yemas axilares fue el ancimidol (0.2 mg.l<sup>-1</sup>). Para la formación de callos con estructuras embriogénicas, la concentración de 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D propiciaron el mayor porcentaje (13.6%). A partir de los embriones somáticos producidos se logró el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas. Se demostró que es posible el desarrollo de la embriogénesis somática en el cv. Navolean no solo a partir de *scalps* de multiyemas.

Palabras clave: ancimidol, plátanos, suspensiones celulares embriogénicas

### ABSTRACT

In order to develop embryogenic cultures in AAB *Musa* genotypes without persistent male inflorescence, the process has had greater success from proliferating meristems for callus formation with embryogenic structures. Based on the previous information, other alternative explant sources for somatic embryogenesis development in cv. Navolean. Meristematic apices were cultured in p5 culture medium supplemented with thidiazuron and ancymidol (0.2, 0.4, 0.6, mg.l<sup>-1</sup>) to obtain axillary buds. Later, axillary buds and proliferated meristems were tested for callus induction with embryogenic structures combinations with different 2,4-D concentrations. The best growth regulator for obtaining axillary buds was ancymidol (0.2 mg.l<sup>-1</sup>). For callus formation with embryogenic structures, axillary buds at 1.0 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D provided a higher percentage (13.6%). These results permitted the development of embryogenic cell suspensions from somatic embryos.

Key words: Ancymidol, embryogenic cell suspension, plantain

### INTRODUCCIÓN

Debido a la aparición en Cuba de la enfermedad Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet las áreas dedicadas al cultivo de los plátanos del grupo AAB, se han ido reemplazado progresivamente por los bananos de cocción (ABB) y por híbridos tetraploides introducidos de la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) (Pérez, 1998).

La regeneración de plantas por medio de la embriogénesis somática permite disponer de un

sistema de multiplicación celular útil para la mejora genética por métodos biotecnológicos (Daniels, 2003). La fuente de explantes iniciales para la inducción de este proceso, constituye uno de los factores más importantes que pueden determinar el éxito o fracaso de la mayoría de las metodologías de regeneración de plantas vía embriogénesis somática. En el caso de los plátanos tipo macho, la formación de callos con estructuras embriogénicas ha tenido mayor éxito al usar como explantes iniciales multiyemas, las cuales son obtenidas durante varios subcultivos en presencia de altas concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) o con la utilización de

tidiazuron (Suprasanna *et al.*, 2002). Sin embargo Reuveni *et al.* (1993) señalaron que el uso de altas concentraciones de citoquinina hace que predominen las yemas adventicias, lo que provocó en *Musa* spp. un incremento de la variabilidad genética de 4-10 veces con respecto a la regeneración por yemas axilares.

Teniendo en cuenta lo anterior se trabajó con el objetivo de evaluar otra fuente de explante inicial para la formación de callos con estructuras embriogénicas y el posterior establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar (cv.) 'Navolean' como modelo para desarrollar la embriogénesis somática en cultivares de plátano vianda, el cual forma parte del Programa de Mejoramiento Genético del Plátano en Cuba a través de técnicas de transformación genética, debido a la calidad del fruto y sus hábitos de consumo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el cv. de plátano vianda 'Navolean' del grupo AAB, procedente del Banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) y se estableció *in vitro* según el procedimiento para la micropropagación de los plátanos y bananos descrito por Vuylsteke (1989).

### Determinación del medio de cultivo para la brotación de yemas axilares

Se cultivaron brotes axilares en el medio de cultivo P5 (Sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementadas con sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (10 mg.l<sup>-1</sup>), ácido indol acético (AIA) (0.17 mg.l<sup>-1</sup>), 6-bencilaminopurina (6-BAP) (2.25 mg.l<sup>-1</sup>), pH 5.8 y gelificado con Agar E (BIOCEN) (6.0 g.l<sup>-1</sup>) según Dhed'a *et al.* (1991). Adicionalmente se incluyó tidiazuron (TDZ) y ancimidol (ANC) (0.2, 0.4, 0.6 mg.l<sup>-1</sup> cada uno individualmente) y como control se empleó el medio de cultivo P4 (Sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementadas con sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (10 mg.l<sup>-1</sup>), AIA (0.17 mg.l<sup>-1</sup>), 6-BAP (22.5 mg.l<sup>-1</sup>), pH 5.8 y gelificado con Phytigel (SIGMA) (2.3 g.l<sup>-1</sup>) según Schoofs (1997).

Se utilizaron 25 brotes por tratamiento colocados en tubos de ensayos de 50 x 25 mm, los cuales fueron incubados a temperatura de 27 ± 2°C, bajo régimen de 16 horas luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 62-68 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 8 horas de oscuridad. Se evaluó a los 18 días de cultivo el número de yemas axilares (YA) formadas en cada tratamiento. Los datos fueron procesados estadísticamente mediante el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Mann-Whitney para hallar

los grupos con diferencias significativas para un nivel de significación menor que 0.01.

### Formación de callos con estructuras embriogénicas

Para formar callos con estructuras embriogénicas se emplearon ápices (2-3 mm) de brotes obtenidos a partir de yemas axilares a los 18 días de cultivo en el tratamiento con la mejor concentración de ANC del experimento anterior. Como control se emplearon *scalps* de multiyemas (MY) (se tomó su parte superior de 4-5 mm de diámetro, denominadas *scalps* por Dhed'a *et al.* (1991).

La extracción de los ápices y los *scalps* se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico modelo STEMI SV11. Se utilizó el medio de cultivo ZZ (semisólido) según Schoofs (1997) (Sales MS reducidas al 50% de su concentración y vitaminas MS, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup> mio-inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, ácido ascórbico 10 mg.l<sup>-1</sup>, zeatina 0.22 mg.l<sup>-1</sup>, pH 5.8 y Phytigel (SIGMA) 2.3 g.l<sup>-1</sup>. Al mismo se le adicionaron las concentraciones de 2,4-D siguientes: 0.5, 1.0 y 1.5 mg.l<sup>-1</sup>.

Por cada tipo de explante inicial, 250 muestras de cada tratamiento estudiado fueron incubadas a 27 ± 2°C en la oscuridad. Se evaluó a las 16 semanas de cultivo el número de callos con estructuras embriogénicas formados y posteriormente se calculó el porcentaje que esto representaba. Para el análisis estadístico se compararon los resultados mediante la prueba de Chi-cuadrado. Se consideró significativo si la significación fue menor que 0.05.

### Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas

Se establecieron suspensiones celulares embriogénicas a partir de embriones somáticos en etapa globular, obtenidos de los callos provenientes de los ápices de brotes de yemas axilares y de los *scalps* de multiyemas. Para ello se emplearon cinco Erlenmeyers de 10 ml de volumen total por tipo de explante inicial, que contenía cada uno 2.0 ml del medio de cultivo ZZ con una concentración de 2,4-D según resultados del experimento anterior. Se inocularon 0.1 gramos de masa fresca (gMF) de embriones somáticos según Santos (2001). Los Erlenmeyers fueron colocados en un agitador orbital modelo INFORS (HT), a una velocidad de 90 r.p.m. y temperatura de 27 ± 2°C, bajo régimen de 16 horas de luz (DFFF de 62-68 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8 horas de oscuridad. Transcurridos 18 días del establecimiento de las suspensiones celulares se evaluó el número de agregados embriogénicos presentes en 1ml de suspensión celular mediante el conteo en una cámara de Neubauer. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación del medio de cultivo para la brotación de yemas axilares

El mayor número de YA se correspondió con los tratamientos donde el medio de cultivo contenía 0.2 y 0.4 mg.l<sup>-1</sup> de ANC (2.65 y 2.20 respectivamente), sin diferencias estadísticas entre ellos y sí con el resto de los tratamientos (Tabla 1) (Figura 1).

Según Ziv *et al.* (1998), el uso de ANC en el medio de cultivo de multiplicación, permite un incremento significativo del número de brotes axilares, fundamentalmente porque inhibe la biosíntesis de giberelinas y con ello reprime el crecimiento y dominancia de la yema apical, lo cual favorece o estimula la brotación de yemas axilares. Lorenzo *et al.* (1998) también señalan, que esto sucede debido a que todos los nutrientes del medio de cultivo son aprovechados para la formación de nuevos brotes y no para la elongación de tallos y hojas.

Cuando se utilizó TDZ fue menor la formación de YA, sin diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas.

Resultados similares en el uso del medio de cultivo P4 fueron obtenidos por Schoofs (1997) al utilizar

diferentes genotipos de *Musa*, donde demostró que existe una dependencia entre la dominancia apical *in vitro* y el genotipo.

Aunque los resultados alcanzados en este experimento, demostraron que para la brotación de las yemas axilares, las concentraciones de 0.2 y 0.4 mg.l<sup>-1</sup> de ancimidol, resultaron las mejores, se seleccionó la concentración de 0.2 mg.l<sup>-1</sup> por ser la más baja estudiada.

### Formación de callos con estructuras embriogénicas

La formación de callos con estructuras embriogénicas en ambos tipos de explantes iniciales (YA y MY) se observó a partir de las 12 semanas de cultivo. Los mismos se caracterizaron por estar formados por glóbulos meristemáticos de color amarillo (callo nodular) con y sin formación de embriones somáticos en la superficie de los glóbulos hasta la obtención de una masa de embriones somáticos similares a los descritos por Dhed'a *et al.* (1991) y Schoofs (1997) (Figura 2).

Cuando se utilizó la concentración de 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, en ambos casos, se alcanzaron los mayores porcentajes de formación de callos con estructuras embriogénicas, YA 13.6% y MY 15.6% (Tabla 2).

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de ancimidol en la brotación de yemas axilares en el cv. 'Navolean'.

Tratamientos		No. de yemas axilares brotadas
Ancimidol (mg.l <sup>-1</sup> )	0.2	2.65 a
	0.4	2.20 a
	0.6	1.76 b
Tidiazuron (mg.l <sup>-1</sup> )	0.2	0.40 c
	0.4	0.25 cd
	0.6	0.15 cd
Medio de cultivo P4		0.05 d
X <sup>2</sup>		104.12*

\*Medias con letras no comunes en las columnas difieren según Mann-Whitney para p<0.01.

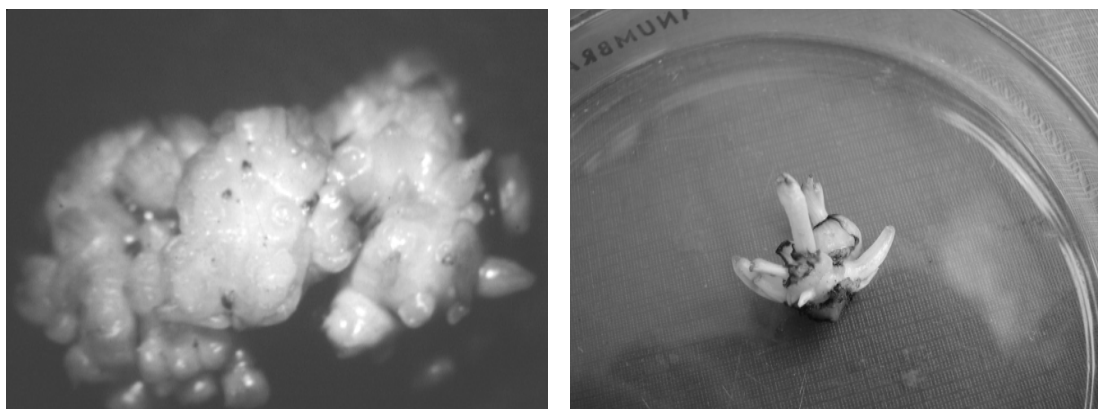


Figura 1. Tipos de explantes iniciales utilizados, multiyemas (izquierda) según Schoofs (1997) y yemas axilares de esta investigación (derecha).

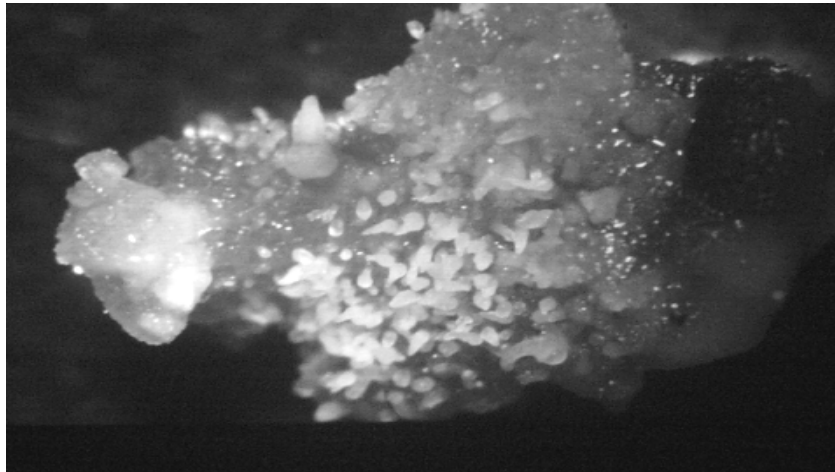


Figura 2. Callos con estructuras embriogénicas en el cv. 'Navolean' formados a partir de ápices de brotes de yemas axilares en el medio de cultivo ZZ con 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D a las 16 semanas de cultivo (6x).

Tabla 2. Formación de callos en el cv. 'Navolean' a partir dos tipos de explantes iniciales a las 16 semanas de cultivo en el medio de cultivo ZZ con diferentes concentraciones de 2,4-D.

Explantes utilizados	Concentración de 2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Formación de callos con estructuras embriogénicas		Formación de callos sin estructuras embriogénicas	
		Número	%	Número	%
Ápices de brotes de yemas axilares	0.5	0	0	250	100
	1.0	34	13.6	216	86.4
	1.5	4	1.6	246	98.4
		$\chi^2 = 23.684 (19.0 < 0.05)$			
<i>Scalps</i> de multiyemas	0.5	3	1.2	247	98.8
	1.0	39	15.6	211	84.4
	1.5	9	3.6	239	95.6
		$\chi^2 = 40.453 (17.7 < 0.05)$			

El mejoramiento de la embriogénesis somática para genotipos que no poseen inflorescencias masculinas persistente o que degeneran durante su desarrollo, ha estado dirigido a perfeccionar la producción de las multiyemas como fuente de explante para inducir la embriogénesis somática, lo cual hace que el uso de ápices de brotes obtenidos a partir de yemas axilares con el mismo objetivo constituya una nueva alternativa para complementar la metodología existente a partir de multiyemas.

Los resultados referidos en la literatura especializada sobre plátanos y bananos, indican que la inducción del proceso embriogénico continúa perfeccionándose también con el uso de otros reguladores del crecimiento como el TDZ para inducir las multiyemas, en un menor tiempo que en el medio de cultivo P4 (Suprasanna *et al.*, 2002; INIBAP, 2003). No obstante a lo anterior, el uso de multiyemas para la inducción de la embriogénesis somática presenta el inconveniente de constituir una fuente de variación

genética debido al origen de su formación (Reuveni e Israeli, 1990).

Teniendo en cuenta lo anterior y por los resultados obtenidos, resulta evidente que el uso de brotes de yemas axilares como explante inicial para desarrollar la embriogénesis somática constituye una nueva alternativa para el cultivar estudiado.

#### **Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas**

Se logró el establecimiento de tres suspensiones celulares embriogénicas de los cinco Erlenmeyer por tratamiento iniciados a partir de embriones somáticos obtenidos de callos con estructuras embriogénicas formados de ápices. En el caso de los *scalps* de las multiyemas se establecieron dos suspensiones celulares embriogénicas. Según Schoofs *et al.* (1999) no todo buen complejo embriogénico dará una buena suspensión celular y señalan a su vez que la

tasa exitosa para los complejos derivados de las multiyemas es uno de dos o uno de cinco.

En ambos tipos de suspensiones celulares, independientemente del material vegetal inicial del cual se tomaron las estructuras embriogénicas para el establecimiento, no se encontraron diferencias estadísticas en relación con el número de agregados embriogénicos formados, ( $26.6 \times 10^4$  para ápices y  $27.2 \times 10^4$  para *scalps*). Las mismas se caracterizaron por estar constituidas por agregados celulares de células embriogénicas pequeñas, esféricas, con un contenido citoplasmático denso, vacuolas pequeñas, gránulos de almidón y una alta relación núcleo/citoplasma.

A partir de las suspensiones celulares embriogénicas se logró la obtención de plantas completas según Lopez *et al.* (2001) y Cabrera *et al.* (2002).

## CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar de plátano vianda 'Navolean', grupo AAB mediante el empleo de ápices de brotes obtenidos a partir de yemas axilares como explante inicial para la formación de callos.

## REFERENCIAS

Cabrera, M, López J, Gómez R, Montano N, Reyes M, Reynaldo D, Ventura JC, Santos A, García M, Basail M y Espinosa E (2002) Multiplicación, histodiferenciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas en plátano 'Navolean' (AAB). *Biotecnología Vegetal* 2 (2): 115-117

Dhed'a, D, Dumortier F, Panis B, Vuylsteke D y De Langhe E (1991) Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135

Desmond, D (2003) Desarrollo de la embriogénesis somática y su empleo en la transformación genética por biobalística en el

cultivar híbrido de plátano 'FHIA 21' (*Musa* spp. AAAB). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP, Santa Clara, Cuba. 123p.

INIBAP (2003) Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 2002. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier

López, J, Montano N, Swennen R, Ventura JC, Schoofs H, Medero V, García M, Del Sol L y Cabrera M (2000) Establecimiento de suspensiones celulares en plátanos vianda del grupo (AAB). *Biotecnología Vegetal* 1(1): 59-61

Lorenzo, J, González B, Escalona M, Teisson C, Espinosa P y Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 197-200

Pérez, L (1998) Control de la Sigatoka negra en Cuba: un enfoque de manejo integrado de la enfermedad. *Infomusa* 7(1): 26-28

Reuveni, O, Israeli Y (1990) Measures to reduce somaclonal variation *in vitro* propagated bananas. *Acta Horticulturae* 257: 307-313

Santos, A, López J, Cabrera M, Montano N, Reinaldo D, Ventura JC, Medero V, García M, Basail M y Rayas A (2002) Obtención de embriones somáticos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el clon de plátano 'Navolean' (AAB). *Biotecnología Vegetal* 2 (2): 107-109

Schoofs, H (1997) The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thesis Ph.D. Leuven, Belgium

Schoofs, H, Panis B, Strosse H, Mayo A, López J, Roux N, Dolezel J y Swennen R (1999) Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *Infomusa* 9(2): 3-6

Suprasanna, P, Sági L, Panis B y Swennen R (2002) Establishment of embryogenic cell suspension cultures from Indian banana cultivars. Abstracts of papers presented during the 4th and final FAO/IAEA research coordination meeting. Belgium, 24-28 september 2001. Leuven

Vuylsteke, DR (1989) Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. En: Withers LA (ed). *Practical Manuals for Handling Crop Germplasm in vitro*. IBPGR, Roma