

Empleo de suspensiones celulares embrionarias y radiaciones Gamma fuente ^{60}Co en la mutagénesis *in vitro* de banano cv. 'Manzano' (*Musa AAB*)

Claudia Beatriz Rodríguez Sierra^{1,2*}, <https://orcid.org/0000-0003-0316-8311>

Ildalmis Bermúdez-Carabaloso², <https://orcid.org/0000-0002-6991-480x>

Mayelin Rodríguez², <https://orcid.org/0000-0003-0088-8305>

Maritza Reyes², <https://orcid.org/0000-0003-0622-8922>

Leonardo Rivero Quintana², <https://orcid.org/0000-0003-3627-9421>

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.

*Autora para correspondencia e-mail: crsierra@uclv.cu

RESUMEN

La inducción de mutaciones *in vitro* combinada con la embriogénesis somática aumenta la eficiencia de los tratamientos mutagénicos. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de las radiaciones Gamma fuente ^{60}Co en suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. 'Manzano' (*Musa AAB*). Se aplicaron diferentes dosis de radiación (30, 40, 50, 60, 70 y 80 Gy) a suspensiones celulares embriogénicas en fase de multiplicación y posteriormente se subcultivaron a medios de cultivo para la formación, maduración y germinación de los embriones somáticos. Se empleó un control sin irradiar. Posteriormente, se trasladaron las plantas regeneradas a casa de cultivo para su aclimatización. A los 45 días se evaluó la supervivencia y las variaciones fenotípicas. De acuerdo con la media ponderada de las variables incluidas se logró seleccionar 40 Gy como la dosis más efectiva (GR50 y la DL50), a partir de las variables número de embriones somáticos germinados y porcentaje de supervivencia. Los resultados de este estudio permiten conocer el rango de radiosensibilidad para la aplicación de radiaciones Gamma fuente ^{60}Co que pueda inducir caracteres mejorados de interés agronómico en banano cv. 'Manzano' para ser empleados en programas de mejora genética.

Palabras clave: dosis de radiación, DL50, embrión somático, GR50, radiosensibilidad

Use of embryogenic cell suspensions and ^{60}Co source gamma radiation during *in vitro* mutagenesis in banana cv. 'Manzano' (*Musa AAB*)

ABSTRACT

The *in vitro* induction of mutations combined with somatic embryogenesis increases the efficiency of mutagenic treatments. This work was carried out with the aim of determining the effect of ^{60}Co source Gamma radiation on embryogenic cell suspensions of banana cv. 'Manzano' (*Musa AAB*). Different doses of radiation (30, 40, 50, 60, 70 and 80 Gy) were applied to embryogenic cell suspensions in the multiplying phase and subsequently subcultured to culture media for the formation, maturation and germination of somatic embryos. A non-irradiated control was used. Subsequently, the regenerated plants were transferred to the greenhouse for their acclimatization. At 45 days, survival and phenotypic variations were evaluated. According to the weighted mean of the variables included, it was possible to select 40 Gy as the most effective dose (GR50 and LD50), based on the variables number of germinated somatic embryos and survival percentage. The results of this study allow us to know the range of radiosensitivity for the application of Gamma radiation from a ^{60}Co source that can induce improved characters of agronomic interest in banana cv. 'Manzano' to be used in genetic improvement programs.

Keywords: GR50, LD50, radiation dose, radiosensitivity, somatic embryo

INTRODUCCIÓN

Los bananos (*Musa* spp.) se encuentran entre las frutas más producidas, comercializadas y consumidas globalmente (FAO, 2020). El cultivar 'Manzano' (*Musa* AAB, subgrupo Silk) destaca entre los consumidores por el sabor de su pulpa, semejante a la manzana, así como por sus propiedades organolépticas (Lim, 2012). Sin embargo, este cultivar es susceptible a hongos fitopatógenos como *Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton (agente causal de la Sigatoka negra) (Pérez *et al.*, 2002) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hansen (agente causal de la Marchitez por *Fusarium*) (Bermúdez-Carabaloso, 2014), por lo que la búsqueda de mutantes de este cultivar ha aumentado con el paso de los años.

Los resultados en el mejoramiento genético en este cultivo, con la aplicación de métodos tradicionales, resultan muy difíciles y demorados (Jain, 2010). Los plátanos y bananos tienen muy bajas tasas de multiplicación clonal, y la mayoría de los cultivares comerciales son poliploides, con una producción de semilla pobre (Ortiz *et al.*, 1995). Estas barreras impiden la hibridación sexual, por lo que la inducción de mutaciones con el empleo de herramientas biotecnológicas ayudarían a acelerar los Programas de mejoramiento genético (López *et al.*, 2017).

Con el fin de aumentar la variabilidad genética y mejorar caracteres como la resistencia a enfermedades, algunos autores (Stover y Buddenhagen, 1986; Tomekpe *et al.*, 2004; Penna *et al.*, 2019; Spencer-Lopes *et al.*, 2021) recomiendan la mejora por mutación en cultivos propagados vegetativamente, como *Musa* spp., para incrementar la frecuencia de mutaciones por encima de la tasa de espontaneidad. Esta técnica constituye una herramienta aplicable en programas de mejoramiento genético de banano.

El amplio uso de los rayos Gamma dentro de los agentes mutagénicos físicos, se ha fundamentado por el alto grado de precisión, reproducibilidad y penetración a través del material biológico (Roux, 2004). Investigaciones como las de Roux y Toloza (2002), Roux (2004) o Damasco *et al.* (2019), entre otros, han demostrado la validez de esta estrategia en el mejoramiento genético de

Musa al seleccionar mutantes con resistencia o tolerancia a enfermedades como la Sigatoka negra, la Marchitez por *Fusarium* o al virus del arpillamiento del cogollo del banano (BBTV por sus siglas en inglés), así como por la obtención de caracteres agronómicos mejorados como el tamaño del racimo, la forma cilíndrica del fruto y la disminución de la altura de la planta (enanismo).

Los métodos para inducir mutaciones generalmente se combinan con técnicas de cultivo de tejidos, ya que aumentan la eficiencia general de los tratamientos mutagénicos (López *et al.*, 2017; Spencer-Lopes *et al.*, 2021). Esto se debe a que acelera la producción de mutantes como resultado del incremento en el índice de propagación y a un mayor número de generaciones por unidad de tiempo y espacio (Morpurgo *et al.*, 1997; Manchanda *et al.*, 2018). Dentro de estas técnicas, la embriogénesis somática permite el manejo de grandes poblaciones de plantas bajo condiciones controladas y simultáneamente evita la formación de quimeras al presentar los embriones un origen unicelular (Roux *et al.*, 2001).

En el cultivar 'Manzano' se han empleado suspensiones celulares embriogénicas (SCE) (Houllou-Kido *et al.*, 2005), protoplastos (Matsumoto y Oka, 1997) y ápices de brotes (Hui *et al.*, 2012) como explantes para protocolos de regeneración de plantas. Sin embargo, aunque algunos trabajos de mutagénesis se han realizado en el cultivar, mediante la irradiación de explantes como ápices (Pérez y Orellana, 1994; Jamaluddin, 1995) y yemas adventicias (Bermúdez *et al.*, 2002), en la búsqueda de resistencia a la Marchitez por *Fusarium* y a Sigatoka negra, nunca antes se han realizado estudios de inducción de variabilidad genética a través de radiaciones Gamma en SCE de este cultivar.

El uso de SCE, como técnica de cultivo en apoyo a la mutagénesis por rayos Gamma, se evidencia, escasamente, en los trabajos de Roux *et al.* (2004), Kulkarni *et al.* (2004), López *et al.* (2008), Sales *et al.* (2013), Bermúdez-Carabaloso *et al.* (2016) y López *et al.* (2017), enfocados, principalmente, en cultivares del grupo AA o cultivares del subgrupo Cavendish. Más allá, la supervivencia de los tejidos o células irradiados no ha sido uniforme. Roux *et al.* (2004) refirieron que las

SCE de cultivares 'Williams' (*Musa* AAA) y 'Three Hand Planty' (*Musa* AAB) crecieron incluso a una dosis muy alta de 250 Gy. Mientras, Kulkarni *et al.* (2004), observaron que una dosis de 40 Gy en el cultivar 'Grande naine' resultaba completamente letal, debido a los niveles de hidratación de las células, por lo que las SCE fueron más radiosensibles. En comparación, informes posteriores indicaron que dosis de hasta 70 Gy fueron letales en cultivos de ápices de brotes en el cultivar 'Grande naine' (López *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta los resultados de estos autores referidos a que la respuesta a la dosis de radiación empleada varió con la constitución genética de cada cultivar y el tipo de explante utilizado, se hace necesario realizar estudios para determinar el efecto de las radiaciones Gamma fuente ^{60}Co en suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. 'Manzano' (*Musa* AAB).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron suspensiones celulares embriogénicas (SCE) del cultivar 'Manzano' (*Musa* AAB) en fase de multiplicación, con cuatro días después del último subcultivo. Las SCE se obtuvieron a partir de la metodología de *scalps* propuesta por López *et al.* (2017).

Tratamiento mutagénico

La suspensión celular se preparó al 25% del volumen de células sedimentadas y se adicionaron 0.5 ml de células en tubos (Eppendorf) de 1.5 ml de capacidad (seis por cada dosis de radiación). Para determinar la dosis más efectiva de radiación con rayos Gamma fuente ^{60}Co para inducir variabilidad se estudiaron siete tratamientos (30, 40, 50, 60, 70 y 80 Gy) y un tratamiento control sin irradiar. Para ello se utilizó un irradiador MPX-25, con una potencia de dosis de 11.3 Gy min^{-1} . El equipo se encuentra en el Centro de Aplicaciones Tecnológicas y desarrollo Nuclear (CEADEN) de La Habana, Cuba.

Después de la irradiación, las células se transfirieron al medio de cultivo RD1 propuesto por Gómez-Kosky *et al.* (2002) para formar embriones somáticos, el cual estaba compuesto por sales MS (Murashige y Skoog,

1962) (Duchefa) al 50%, vitaminas MS, ácido ascórbico 100 mg l^{-1} , mio-inositol 100 mg l^{-1} , sacarosa 30 g l^{-1} y Phytigel® (SIGMA) 2.2 g l^{-1} . En todos los casos el pH se ajustó a 5.7 antes de la esterilización en autoclave. Se adicionaron 10 ml de medio de cultivo por placa de Petri y se descargó el contenido de cada tubo (Eppendorf) encima de una malla de poliestireno (1 cm^2) de tamaño de poro de $50 \mu\text{m}$ cada una, las cuales se colocaron encima del papel de filtro estéril para eliminar el medio de cultivo líquido y sobre estas se depositó la suspensión de células embriogénicas. Las condiciones de cultivo fueron oscuridad total a $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Posteriormente, el contenido de cada muestra se subcultivó a placas de Petri con medio de cultivo de maduración de embriones somáticos, propuesto por Gómez-Kosky *et al.* (2002) compuesto por sales MS, biotina 1.0 mg l^{-1} , 6-bencilaminopurina (6-BAP) 0.25 mg l^{-1} , ácido indol acético (AIA) 0.75 mg l^{-1} , sacarosa 45 g l^{-1} y Phytigel® 2.2 g l^{-1} . Se tomaron grupos de 8-10 embriones somáticos y se colocaron 50 grupos por placa de Petri.

Las condiciones de cultivo fueron oscuridad total a $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A los 30 días se subcultivaron los embriones somáticos maduros al medio de cultivo de germinación compuesto por sales MS, vitaminas MS, 6-BAP 0.5 mg l^{-1} , AIA 2.0 mg l^{-1} , mio-inositol 100 mg l^{-1} , sacarosa 30 g l^{-1} . Como agente gelificante se utilizó Phytigel® 2.2 g l^{-1} . Se colocaron 15 embriones somáticos por frasco de cultivo de 250 ml de capacidad con 30 ml de medio de cultivo. Se cuantificó el número de embriones somáticos germinados a los 90 días de cultivo. Las condiciones de cultivo fueron cámaras de crecimiento con luz solar y fotoperíodo propio de la época del año, a $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y a una densidad de flujo de fotones fotosintéticas (DFFF) de $50 - 62.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se cuantificó el número de embriones somáticos germinados a los 90 días de cultivo. Con los datos obtenidos de la evaluación, se calculó la dosis de crecimiento medio (GR50) (dosis que reduce el crecimiento en un 50%) (Suprasanna *et al.*, 2012).

Posteriormente, los embriones somáticos completamente germinados se colocaron en el medio de cultivo de crecimiento (sales MS, sacarosa 30 g l^{-1} y Phytigel® 2.2 g l^{-1}) hasta lograr una altura de la planta de cuatro a

cinco centímetros y más de tres hojas emitidas. Las condiciones de cultivo fueron similares a la germinación de los embriones somáticos.

Las plantas regeneradas se trasladaron a casa de cultivo, donde se plantaron en cajas de polietileno de 45 orificios de 120 cm³ de volumen. La temperatura fue la ambiental y el riego se realizó tres veces al día con una duración de 10 minutos por cada microaspersión. El sustrato empleado estaba compuesto por una mezcla 3:1 de materia orgánica y zeolita, respectivamente. A los 45 días de plantadas se cuantificó el número de plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia por tratamiento. Se evaluaron caracteres morfológicos como: altura de la planta hasta la inserción de segunda y tercera hojas (cm), longitud de la segunda hoja (cm), ancho de la segunda hoja (cm), largo del peciolo de la segunda hoja (cm), número de hojas totales (unidades), color del follaje, del pseudotallo y del peciolo basado en el descriptor de *Musa* spp. (Daniells *et al.*, 2001). Con los datos obtenidos de la supervivencia se calculó la dosis letal media que causa un 50% de mortalidad (DL50) por cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental empleado fue completamente aleatorizado. El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó con la ayuda del Paquete estadístico *Statistic Packaged for Social Science* (SPSS) versión 21.0 para Windows (Microsoft®). Los

datos de las variables evaluadas se sometieron a análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se utilizó un análisis de regresión lineal entre las dosis de radiación de 0 y 80 Gy para las variables número de embriones germinados y porcentaje de supervivencia de las plantas en casa de cultivo. Con las ecuaciones resultantes se calculó la GR50 y DL50. La dosis más efectiva se calculó con las medias ponderadas de las variables incluidas. Para el caso de los caracteres morfológicos cuantitativos se emplearon las pruebas H de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para las comparaciones entre las parejas de grupos con un nivel de significación para $p < 0.05$ al no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de regresión lineal indicó que la germinación de los embriones somáticos se afectó según la dosis de radiación aplicada con una relación significativa y lineal entre las variables según el análisis de varianza ($p=0.001$). A medida que aumentaron las dosis de radiaciones, disminuyó el número de embriones somáticos germinados con respecto al tratamiento control ($R^2=0.8711$). Los resultados mostraron una tendencia lineal descendente. De acuerdo con la ecuación de regresión, la GR50 se presentó a los 41.9 Gy, con la cual germinó el 38.5% de embriones somáticos (Figura 1, Figura 2). Estos resultados fueron similares a los referidos por Bermúdez-Carabaloso *et al.* (2016) en el cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA), donde también coincidió la GR 50 en 40 Gy.

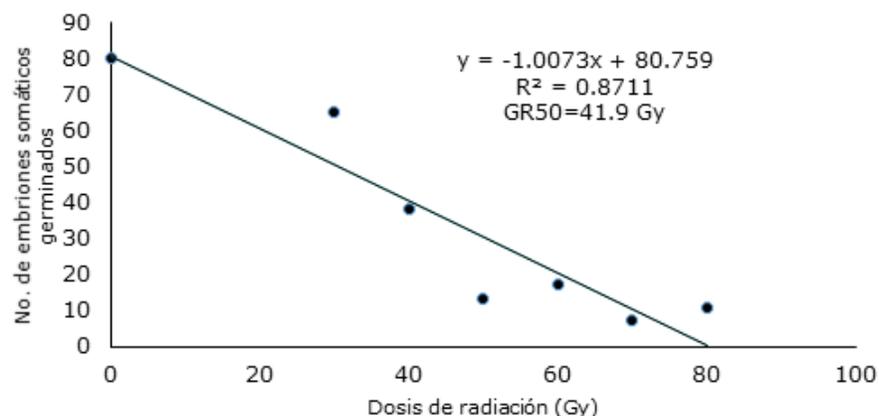


Figura 1. Efecto de las dosis de radiación Gamma en la germinación de embriones somáticos a los 90 días después de la irradiación en el cv. de banano 'Manzano' (*Musa* AAB).

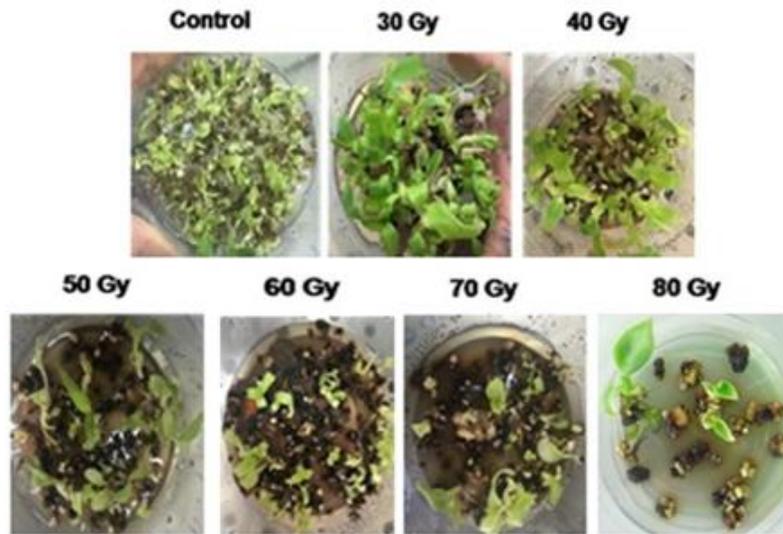


Figura 2. Embriones somáticos germinados de banano cv. 'Manzano' (*Musa AAB*) después de 90 días de irradiación de las suspensiones celulares embriogénicas.

La dosis de crecimiento medio determinada (GR50) resultó consistente con los rangos propuestos por Roux (2004), Jain (2010) y López *et al.* (2020) para cultivares triploides (AAA y AAB), entre 30 Gy y 40 Gy. En contraposición, Kulkarni *et al.* (2004) observaron que una dosis de 40 Gy fue letal en cultivos de suspensiones celulares del cv. 'Grande naine', aunque los autores lo atribuyeron a que las SCE resultaron más radiosensibles, debido a los altos niveles de hidratación que presentaban. También, Mishra *et al.* (2007) encontraron que una dosis de 30 Gy aplicada a brotes del cv. 'Rasthali' (*Musa AAB*, sinonimia 'Manzano') producía daños letales durante el desarrollo de las plántulas, y recomendaban dosis de 10 y 20 Gy para inducir buenas respuestas en su desarrollo.

En general, existe la tendencia de usar dosis bajas de radiaciones que provoquen pequeños cambios en los cromosomas (Roux, 2004), sin embargo, estos resultados producen bajas frecuencias de mutaciones. Contrario a lo anterior, Roux *et al.* (2004) informaron que las SCE de los cultivares 'Williams' (*Musa AAA*) y 'Three Hand Planty' (*Musa AAB*) crecieron incluso a dosis de 250 Gy. Otros autores indicaron que la GR50 y DL50 para SCE de estos mismos cultivares se encontraba entre 50 y 75 Gy, respectivamente (Roux *et al.*, 2009). Estas diferencias pueden vincularse, según Kulkarni *et al.* (2007), con el genotipo, estado fisiológico del material y contenido de

agua de la línea celular. Considerando los resultados de este trabajo se confirma que es necesario evaluar en cada cultivar el efecto de las dosis de radiación que producen variabilidad.

La interacción de rayos Gamma con moléculas de agua, produce radicales libres, que pueden reaccionar con macromoléculas y causar daños a las proteínas, lo que conlleva a un decrecimiento de las funciones celulares y cambios de estructura. Al mismo tiempo, pueden formar sustancias tóxicas como el peróxido de hidrógeno, el cual contribuye a la destrucción de las células y causa la muerte de la planta (Bermúdez-Carballoso *et al.*, 2016; Dehgahi y Joniyasa, 2017). La baja capacidad de germinación de los embriones somáticos con dosis superiores a 40 Gy es consistente con estos criterios, por lo que puede atribuirse al efecto tóxico de las radiaciones sobre las células, que ocasionaron una reducción de la competencia de esas células y sus progenies.

El análisis de resultados en casa de cultivo evidenció que a medida que aumentaron las dosis de radiación que se aplicaron a las SCE, disminuyó la supervivencia en casa de cultivo de las plantas regeneradas ($R^2=0.998$), con una relación significativa entre las variables ($p=0.001$). La supervivencia mostró una tendencia lineal descendente. La DL 50 calculada a partir de la ecuación fue de 41.6

Gy (Figura 3). Con la dosis de 40 Gy el 54% de plantas regeneradas sobrevivieron. Resultados similares obtuvieron Bermúdez-Carballoso *et al.* (2016) en el cv. 'Grande naine', con un 55% de supervivencia de las plantas irradiadas con una dosis de 40 Gy. Varios autores han indicado que la irradiación en los tejidos vegetales induce estrés y por tanto se puede afectar la supervivencia de las plantas. Sumado a ello, altas dosis de rayos Gamma causan reducción en el porcentaje de supervivencia y crecimiento, lo cual puede tener mayores efectos biológicos (Hase *et al.*, 2002; Taheri *et al.*, 2014). Esto pudiera justificar que solo el 16.6% de las plantas regeneradas de SCE irradiadas con la dosis de 80 Gy lograra desarrollarse en casa de cultivo. Este fue el valor más bajo de supervivencia, que contrasta con los resultados de la germinación y abre nuevas interrogantes sobre los mecanismos involucrados en el efecto de las radiaciones Gamma sobre las suspensiones celulares que luego de ser irradiadas forman embriones, regeneran plantas pero se afecta la supervivencia de estas en casa de cultivo.

En cuanto a los caracteres morfológicos evaluados (Figura 4), el carácter altura de la planta hasta la inserción de segunda y tercera hoja emitida fue afectado por la dosis de radiación (Figura 4 A). A medida que aumentó la dosis se redujo la altura de las plantas. Relacionado con lo anterior, García *et al.* (2002) también registraron una disminución en la altura de las plantas regeneradas a partir de ápices de yemas adventicias del cv. 'Grande

naine' irradiados con una dosis de rayos Gamma de 25 Gy. Estos resultados pudieran ser tomados en cuenta a la hora de buscar mutantes con reducción de altura, con el fin de disminuir los daños provocados por el viento y facilitar el manejo en condiciones de campo.

Con la dosis de radiación menor (30 Gy) no se afectaron las variables largo y ancho de la segunda hoja (Figura 4 B y C), así como la longitud del peciolo (Figura 4 D) al compararse con el control sin irradiar. Este resultado se pudiera atribuir a que bajas dosis de radiación inducen una estimulación del crecimiento de los tejidos vegetales. Similares resultados fueron referidos por Ali *et al.* (2020) al evaluar el efecto de la mutagénesis *in vitro* en banano cv. 'Basrai' (*Musa* AAB). Dichos autores encontraron que bajas dosis de radiación Gamma (10 y 20 Gy) jugaron un rol importante en la estimulación del crecimiento de los explantes y la formación de nuevos brotes, así como en la elongación y desarrollo de las hojas. En el presente estudio, con altas dosis se produjo una inhibición del crecimiento, a partir de los 40 Gy, todas las variables fueron significativamente diferentes a excepción de la longitud de la segunda hoja emitida, con respecto a 30 Gy y al control. De igual forma, Chai *et al.* (2004), al irradiar yemas múltiples en el cv. 'Pisang Berrangan' (*Musa* AAA), concluyeron que a medida que la dosis de radiación aumentaba, la tasa de mutaciones tendía a ser mayor. Sin embargo, dosis elevadas pueden ocasionar el rompimiento de los cromosomas y resultan en mayor frecuencia de mutaciones cromosómicas y genómicas (Pérez, 1998).

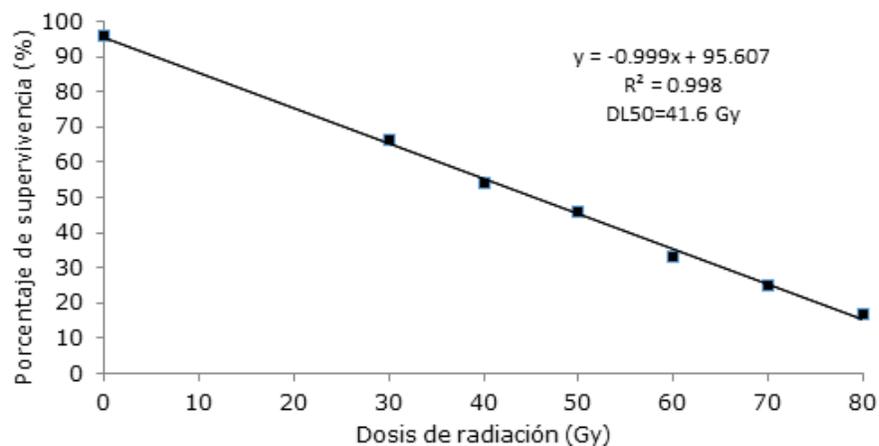


Figura 3. Efecto de las dosis de radiación Gamma en la supervivencia de plantas regeneradas de banano cv. 'Manzano' (*Musa* AAB) a los 45 días de plantadas en casa de cultivo.

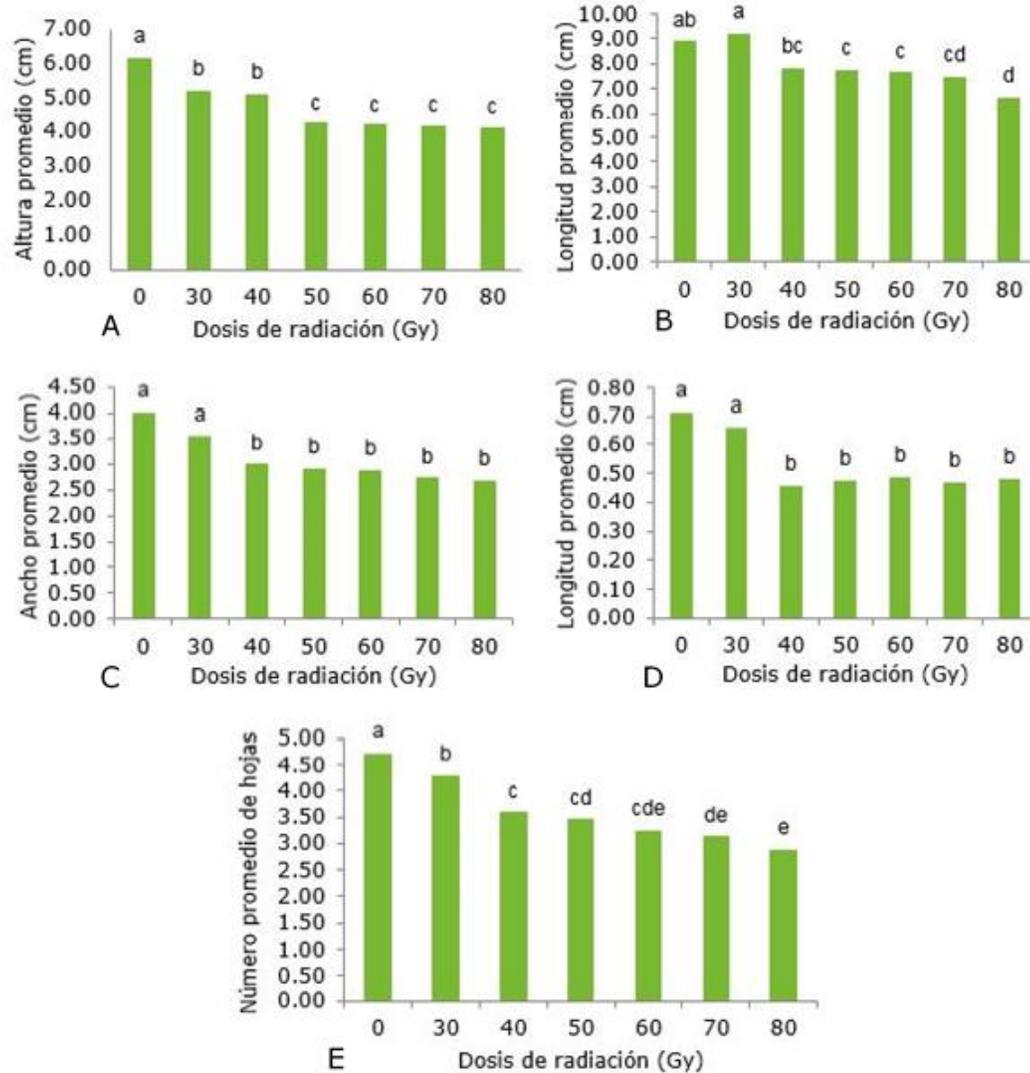


Figura 4. Caracteres morfológicos cuantitativos de plantas de banano cultivar ‘Manzano’ (*Musa* AAB) a los 45 días de plantadas en casa de cultivo. A- Altura de la planta hasta la inserción de la segunda y tercera hoja emitida, B- Longitud de la segunda hoja, C- Ancho de la segunda hoja, D- Longitud del peciolo de la segunda hoja, E- Número promedio de hojas, según la dosis de radiación Gamma fuente ^{60}Co . Letras desiguales sobre barras para cada variable, indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskall Wallis y U de Mann Whitney ($p \leq 0.05$).

La aplicación de rayos Gamma fuente ^{60}Co provocó una reducción del número de hojas totales en las plantas irradiadas con respecto al control (Figura 4 E).

De los caracteres cualitativos evaluados, los que mayor variabilidad mostraron según las dosis de radiación, fueron el color del pseudotallo y del peciolo (Tabla 1).

Para el color del follaje, no se observó variabilidad a excepción de las plantas

irradiadas con 70 Gy. No obstante, más del 50% de las plantas de ese tratamiento mantuvieron color verde, correspondiéndose con el control. De acuerdo con el descriptor de *Musa* spp. (Daniells *et al.*, 2001), las características del cultivar ‘Manzano’ son pseudotallo rosa-rojizo y peciolo verde, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en el tratamiento control (Figura 5).

El color del pseudotallo (Figura 5 A), con las dosis de radiación de 30 Gy y 40 Gy, se

Tabla 1. Frecuencia de variación (%) de caracteres morfológicos cualitativos, según dosis de radiación, de plantas de *Musa* spp. cultivar 'Manzano' (AAB) a los 45 días de plantadas en casa de cultivo.

Dosis de radiación (Gy)	Color del follaje (%)	Color de pseudotallo (%)	Color de peciolo (%)
0	0.00	0.00	0.00
30	0.00	45.80	54.16
40	0.00	25.00	75.00
50	0.00	70.83	29.16
60	0.00	79.16	20.84
70	0.00	87.50	12.50
80	0.00	91.67	8.33

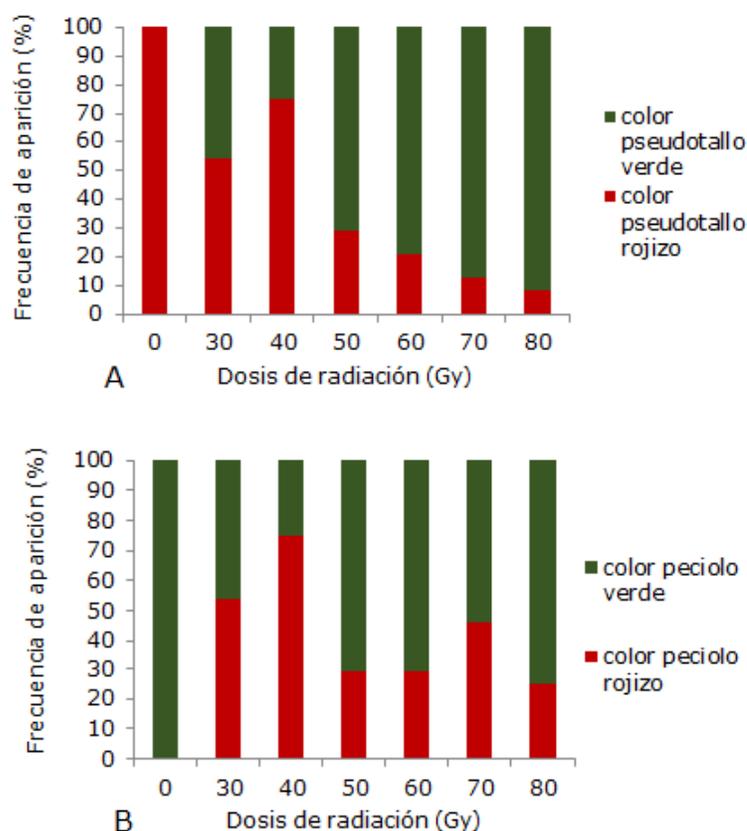


Figura 5. Frecuencia de aparición de los caracteres morfológicos cualitativos, según dosis de radiación en plantas regeneradas a partir de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar 'Manzano' a los 45 días. A-Color del pseudotallo. B-Color del peciolo.

mantuvo rojizo en un porcentaje por encima del 50%. Sin embargo, las plantas irradiadas con dosis superiores a 40 Gy sí se vieron alteradas en su mayoría con un cambio de color verde, lo que implicaría que este es un carácter más estable y que se requieren dosis de más de 40 Gy para su variación. No obstante, García *et al.* (2002) registraron

cambios en la coloración del pseudotallo con la aplicación de una dosis más baja de 25 Gy en yemas adventicias del cv. 'Grande naine'.

Para el color del peciolo (Figura 5 B), los tratamientos superiores a 40 Gy mantuvieron, por encima del 50% el color verde, en correspondencia con el control, mientras que

dosis más bajas de 30 y 40 Gy sí causaron variación rojiza del peciolo. Este resultado guarda relación con las dosis GR50 y DL50 obtenidas durante el estudio. De forma similar, Novak *et al.* (1990) informaron de la presencia de variaciones fenotípicas considerables a nivel de casa de cultivo entre las plantas de banano regeneradas a partir de yemas irradiadas del cv. 'Grande naine'. De acuerdo con Israeli *et al.* (1995), entre las principales variaciones en caracteres morfológicos cualitativos, se encuentran los cambios de color del pseudotallo que involucran franjas negras, rojizas, verde pálidas y carmelitas, y generalmente se asocian a cambios de color en el peciolo.

De acuerdo con la media ponderada se logró seleccionar 40 Gy como la dosis más efectiva (GR50 y la DL50), a partir de las variables número de embriones somáticos germinados y porcentaje de supervivencia de plantas regeneradas. Para las plantas propagadas vegetativamente como el banano, la inducción de mutaciones de conjunto con la embriogénesis somática como herramienta para la mejora genética, resulta de gran interés por la posibilidad que brinda de manejar grandes poblaciones de células, embriones o plantas en espacios reducidos, así como por la disminución de las quimeras resultantes del tratamiento mutagénico.

Con la presente investigación se logra por primera vez regenerar plantas de banano cv. 'Manzano' a partir de SCE irradiadas con rayos Gamma fuente ^{60}Co . Se demuestra que mediante la combinación del empleo de este tipo de explante y la mutagénesis *in vitro* se puede incrementar la variabilidad genética en este cultivar, lo cual constituye una herramienta muy valiosa en manos de los mejoradores genéticos.

CONCLUSIONES

Las radiaciones Gamma fuente ^{60}Co aplicadas en SCE de banano cv. 'Manzano' (*Musa* AAB) afecta la germinación de los embriones somáticos y la supervivencia de las plantas regeneradas. La dosis más efectiva de radiaciones en este cultivar está alrededor de 40 Gy, según la media ponderada de las variables número de embriones somáticos germinados y porcentaje de supervivencia, obtenidos a partir de la GR50 y DL50, respectivamente. Lo

resultados puede ser aplicados en Programas de Mejoramiento genético de este cultivar.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue en parte financiado a través del proyecto: Propuesta de cultivares de *Musa* spp. tolerantes a factores bióticos y abióticos obtenidos por nuevos métodos biotecnológicos para el desarrollo agrícola local (código P131LH001.52) financiado por el Programa Nacional de Producción de Alimentos y su agroindustria del CITMA. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos. La decisión de publicar o la preparación del manuscrito fue de las instituciones participantes y el colectivo de autores del proyecto. Se agradece al Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN) de La Habana, Cuba por su contribución en la irradiación de los materiales vegetales.

Conflicto de interés

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización IBC y CBRS, Investigación IBC, CBRS, MRV, MRU, LRQ, Metodología IBC, CBRS, MRV, MRU, Supervisión IBC, Escritura-Primera redacción CBRS, Escritura-Revisión y Edición IBC, CBRS.

REFERENCIAS

Ali M, Nizamani GS, Khan MT, Yasmeen S, Siddiqui A, Khan IA, Nizamani MR, Nizamani F, Siddiqui MA, Khaskheli MA (2020) Implications of *in vitro* mutagenesis in Banana (*Musa* spp.). Pure and Applied Biology 9: 1230-1241; doi: 10.19045/bspab.2020.90003

Bermúdez-Caraballosa I (2014) Herramientas biotecnológicas para el combate de la raza 4 Tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en *Musa* spp. Biotecnología Vegetal 14(4): 195 – 202

Bermúdez-Caraballosa I, Rodríguez M, Reyes M, Gómez-Kosky R, Chong-Pérez B, Rivero L (2016) Mutagénesis *in vitro* en suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. Grande naine (*Musa* AAA). Biotecnología Vegetal 16(2): 103-111

- Bermúdez I, Herrera L, Orellana Pérez P, Veitia N, Romero C, Clavelo J, García L, Acosta M, García R, Padrón Y (2002) Estudio en condiciones de campo de poblaciones de los clones de banano 'Manzano'(AAB) y 'Gros Michel'(AAA) para la selección de plantas con posible resistencia al mal de Panamá. *Infomusa* 11(2): 7-8
- Chai M, Ho Y, Liew K, Asif J (2004) Biotechnology and *in vitro* mutagenesis for banana improvement. En: Jain SM, Swennen R (eds). *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Proceedings of a meeting held in Leuven, Belgium, 24-28 September 2001*, pp. 59-77. Science Publishers Inc., Enfield; ISBN: 1578083400
- Damasco OP, De la Cueva F, Descalsota JC, Tayobong RRP (2019) Gamma radiation and *in vitro* induced Banana Bunchy Top Virus (BBTV) resistant mutant lines of Banana cv 'Lakatan'(Musa sp., AA). *Philippine Journal of Science* 149(SI): 159-173
- Daniells J, Jenny C, Karamura D, Tomepke K (eds) (2001) *Musalogue: a catalogue of Musa germplasm: diversity in the genus Musa*. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier; ISBN: 2-910810-42-9
- Dehghani R, Joniyasa A (2017) Gamma irradiation induced variation in *Dendrobium sonia*-28 orchid protocorm-like bodies (PLBs). *Fungal Genomics and Biology* 7: 151
- FAO (2020) Análisis del mercado del banano de 2019. Disponible en: <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/bananas/es/>. Consultado 15/01/2021
- García L, Pérez P, Bermúdez I, Orellana Pérez P, Veitia N, Padrón Y, Romero C (2002) Estudio comparativo de la variabilidad producida por la inducción de mutaciones y el cultivo de tejidos en banano (*Musa* sp.) cv. 'Grande naine'. *Infomusa* 11(2): 4-6
- Gómez-Kosky R, de Faria-Silva M, Posada-Pérez L, Gilliard T, Bernal-Martínez F, Reyes-Vega M, Chávez-Milian M, Quiala-Mendoza E (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 21-26; doi: 10.1023/A:1012905825307
- Hase Y, Yamaguchi M, Inoue M, Tanaka A (2002) Reduction of survival and induction of chromosome aberrations in tobacco irradiated by carbon ions with different linear energy transfers. *International journal of radiation biology* 78: 799-806; doi: 10.1080/09553000210152971
- Houllou-Kido LM, Kido EA, Falco MC, Silva MDC, Figueira AVDO, Nogueira NDL, Rossi ML, Tulmann A (2005) Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 1081-1086; doi: 10.1590/S0100-204X2005001100005
- Hui AV, Bhatt A, Keng CL (2012) Micropropagation of *Musa acuminata* x *M. balbisiana* cv. Pisang Awak (ABB genome) and three other cultivars. *Pakistan Journal of Botany* 44: 777-780
- Israeli Y, Lahav E, Reuveni O (1995) *In vitro* culture of bananas. En: Gowen S (ed). *Bananas and plantains*, pp. 147-178. Springer, Dordrecht; doi: 10.1007/978-94-011-0737-2_6
- Jain SM (2010) *In vitro* mutagenesis in banana (*Musa* spp.) improvement. *Acta Horticulturae* 879: 605-614; doi: 10.17660/ActaHortic.2010.879.67
- Jamaluddin SH (1995) Mutation breeding of banana in Malaysia. *Musarama* 7(1): 5
- Kulkarni V, Ganapathi T, Suprasanna P, Bapat V (2007) *In vitro* mutagenesis in banana (*Musa* spp.) using gamma irradiation. En: Jain SM, Häggman H (eds). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*, pp. 543-559. Springer, Dordrecht; doi: 10.1007/978-1-4020-6352-7_48
- Kulkarni VM, Ganapathi TR, Bapat VA, Rao PS (2004) Establishment of cell-suspension cultures in banana cv. Grand Naine and evaluation of its sensitivity to gamma-irradiation. *Current Science* 86(7): 902-904
- Lim TK (2012) *Musa acuminata* x *balbisiana* (AAB Group) 'Silk'. En: Lim TK (ed). *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume*

- 3, Fruits, pp. 554-556. Springer, Dordrecht; doi: 10.1007/978-94-007-2534-8_73
- López J, Montano N, Reinaldo D (2008) Development of a methodology for the propagation of 'Calcutta 4' (AA) and plantain genotypes from embryogenic cell suspensions and its interface with mutation breeding. International Nuclear Information System 40(03): IAEA-CN—167
- López J, Rayas A, Santos A, Medero V, Beovides Y, Basail M (2017) Mutation induction using gamma irradiation and embryogenic cell suspensions in plantain (*Musa* spp.). En: Jankowicz-Cieslak J, Tai T, Kumlehn J, Till B (eds). Biotechnologies for plant mutation breeding, pp. 55-71. Springer, Cham; doi: 10.1007/978-3-319-45021-6_4
- López J, Santos-Ordoñez E, González L (2020) Complementation of Bananas Conventional Breeding Programs through Biotechnological Genetic Improvement. En: Chong PA, Newman DJ, Steinmacher DA (eds). Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery, pp. 25-50. Springer, Cham; doi: 10.1007/978-3-030-51358-0
- Manchanda P, Gill MIS, Megha S, Gosal SS (2018) Production of superelite planting material through *in vitro* culturing in banana. En: Gosal S, Wani S (eds). Biotechnologies of Crop Improvement, volume 1, pp. 93-129. Springer, Cham; doi: 10.1007/978-3-319-78283-6_3
- Matsumoto K, Oka S (1998) Plant regeneration from protoplasts of a brazilian dessert banana (*Musa* spp., AAB group). Acta Horticulturae 490: 455-462; doi: 10.17660/ActaHortic.1998.490.47
- Mishra P, Ganapathi T, Suprasanna P, Bapat V (2007) Effect of single and recurrent gamma irradiation on *in vitro* shoot cultures of banana. International Journal of Fruit Science 7: 47-57; doi: 10.1300/J492v07n01_05
- Morpurgo R, Brunner H, Grasso G, Duren MV, Roux N, Afza R (1997) Enigma of banana breeding: A challenge for biotechnology. Agro Food Industry Hi-Tech 8(4): 16-21
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15: 473-497
- Novak F, Afza R, Duren MV, Omar M (1990) Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa* cvs). Tropical Agriculture 67(1): 21-28
- Ortiz R, Ferris RSB, Vuylsteke DR (1995) Banana and plantain breeding. En: Gowen S (ed). Bananas and Plantains, World Crop Series, pp. 110-146. Springer, Dordrecht; doi: 10.1007/978-94-011-0737-2_5
- Penna S, Ghag SB, Ganapathi TR, Jain SM (2019) Induced genetic diversity in banana. En: Nandwani D (ed). Genetic Diversity in Horticultural Plants. Sustainable Development and Biodiversity, volume 22, pp. 273-297. Springer, Cham; doi: 10.1007/978-3-319-96454-6_10
- Pérez JN (1998) Mutagénesis *in vitro*. En: Pérez JN (ed). Propagación y Mejora Genética de las Plantas por Biotecnología, pp. 229-311. IBP, Santa Clara; ISBN: 959-7122-02-2
- Pérez J, Orellana P (1994) *Musa* improvement in Cuba. En: Jones DR (ed). The improvement and testing of *Musa*: a global Partnership, La Lima, Honduras, pp. 203-206. INIBAP, Montpellier; ISBN: 2-910810-02-X
- Pérez L, Álvarez JM, Pérez M (2002) Economic impact and management of black leaf streak disease in Cuba. En: Jacome L, Lepoivre P, Marin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (eds). *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook, Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases held in San José, Costa Rica on 20-23 May 2002, pp. 71-83. INIBAP, Montpellier; ISBN: 2910810577
- Roux N, Dolezel J, Swennen R, Zapata-Arias FJ (2001) Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 66: 189-197; doi: 10.1023/A:1010624005192
- Roux N, Toloza A (2002) Update in resistance to black Sigatoka through induced mutations. Acorbat 2002: 175-183

- Roux N (2004) Mutation induction in *Musa* review. En: Jain SM, Swennen R (eds). Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Proceedings of a meeting held in Leuven, Belgium, pp. 23-32. Science Publishers, Inc., Enfield; ISBN: 1578083400
- Roux N, Toloza A, Dolezel J, Panis B (2004) Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutants in *Musa* spp. En: Jain SM, Swennen R (eds). Banana Improvement: cellular, molecular biology and induced mutations. Proceedings of a meeting held in Leuven, Belgium, pp. 33-43. Science Publishers, Inc., Enfield; ISBN: 1578083400
- Roux N, Toloza A, Strosse H, Busogoro J, Doležel J (2009) Induction and selection of potentially useful mutants in banana. *Acta Horticulturae* 828: 315-322; doi: 10.17660/ActaHortic.2009.828.32
- Sales EK, Lopez J, Espino R, Butardo N, González L (2013) Improvement of bananas through gamma ray irradiation. *Philippine Journal of Crop Science* 38(2): 47-53
- Spencer-Lopes MM, Forster BP, Jankuloski L (2021) Manual de mejoramiento por mutación. FAO, Viena; doi: 10.4060/i9285es
- Stover R, Buddenhagen I (1986) Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41(3): 175-191
- Suprasanna P, Jain SM, Ochatt S, Kulkarni V, Predieri S (2012) Applications of *in vitro* techniques in mutation breeding of vegetatively propagated crops. En: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (eds). Plant mutation breeding and biotechnology, pp. 371-385. CAB International, Wallingford; doi: 10.1079/9781780640853.0371
- Taheri S, Abdullah TL, Ahmad Z, Abdullah NAP (2014) Effect of acute gamma irradiation on *Curcuma alismatifolia* varieties and detection of DNA polymorphism through SSR marker. *BioMed Research International* 2014(631813): 1-18; doi: 10.1155/2014/631813
- Tomekpe K, Jenny C, Escalant JV (2004) A review of conventional improvement strategies for *Musa*. *Infomusa* 13(2): 2-6

Recibido: 21-01-2021
Aceptado: 24-03-2021

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.