

Obtención de embriones somáticos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar de plátano 'Navolean' (AAB)

Arletys Santos*, J. López, M. Cabrera, Nery Montano, Damisela Reinaldo, J.C. Ventura, V. Medero, Magalys García, Milagros Basail, Ayme Rayas. *Autor para correspondencia

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Apdo. 6, Santo Domingo CP 53 000, Villa Clara, e-mail: inivit@ip.etecca.cu

RESUMEN

En el contexto internacional se refiere la obtención de suspensiones celulares en bananos y plátanos con resultados muy alentadores, sin embargo, en Cuba no ha sido así para los cultivares del grupo AAB, siendo necesario abordar los objetivos trabajo siguientes: Multiplicar *in vitro* material vegetal para la toma de los explantes, obtener de cultivos embriogénicos y suspensiones celulares. Para la multiplicación *in vitro* del material vegetal como fuente donante de explantes se estudiaron diferentes concentraciones de 6-BAP y AIA. La inducción de cultivos embriogénicos se realizó a partir de «scalps», incubados en el medio ZZ sólido. Las suspensiones celulares se establecieron en Erlenmeyers de 10 ml y 25 ml en el medio ZZ líquido. El mejor medio de cultivo para la multiplicación de los explantes fue el MS, (1962) (sales y vitaminas), tiamina adicional (1 mg.l⁻¹), sacarosa (40 g.l⁻¹), 4.50 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 0.88 mg.l⁻¹ de AIA y gelificado con agar (6.0 g.l⁻¹) (Medio 7). Se obtuvo un 4.66% de formación de callos con cultivos embriogénicos y se logró el establecimiento de las suspensiones celulares a los 20 días de la incubación en Erlenmeyer de 10 ml y cambios de medio de cultivo cada tres días.

Palabras clave: embriogénesis somática, plátano vianda, scalps

ABSTRACT

Cells suspension of plantains and bananas with promising results have been reported internationally, however, in Cuba it is not at so for AAB group. So, the following working objectives have to be considered: *in vitro* multiplication of the material used as explant source. For *in vitro* multiplication of the material used as explant source. For *in vitro* multiplication of the material, several 6-BAP and IAA concentration were studied. Induction of embryogenic cultures was the developed form "scalps" incubated in solid medium ZZ. Suspensions were established in 10 ml and 25 ml Erlenmeyers containing liquid medium ZZ. The best medium for explant multiplication was MS (salts and vitamins), additional thiamin (1 mg.l⁻¹), sucrose (40 g.l⁻¹); 4.50 mg.l⁻¹ 6-BAP, 0.88mg.l⁻¹ IAA and solidified agar (6.0 g.l⁻¹) (medium 7). A 4.66% callus formation with embryogenic cultures was obtained, and cell suspensions were established 20 days after incubation in 10 ml Erlenmeyers. Media were changed every third day.

Key Words: somatic embryogenesis, plantain, scalps

INTRODUCCIÓN

En Cuba los bananos de cocción (plátanos burros, ABB) y tetraploides introducidos de la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas, (FHIA), han ido progresivamente reemplazando las áreas dedicadas al cultivo de plátanos Viandas o machos, AAB, debido a los bajos rendimientos y la susceptibilidad a las enfermedades de estos últimos.

La transferencia de nuevos genes en el genoma de las plantas puede resultar en un incremento en la tolerancia a estrés abiótico, protección contra agentes patógenos o plagas, puede mejorar las cualidades fisiológicas o nutricionales y las propiedades de almacenamiento. La introducción de resistencia por las técnicas de transformación genética en este cultivo tiene un valor incalculable

(Sagi, 2000), limitada en Cuba aún su aplicación en los plátanos vianda por la no existencia de un sistema eficiente de regeneración de plantas a nivel celular.

Todos estos obstáculos de los plátanos Viandas (machos) que tradicionalmente se cultivan, convierte la obtención de nuevos cultivares en una prioridad urgente. Teniendo en cuenta la problemática planteada fue necesario abordar los objetivos de trabajo siguientes: Multiplicar *in vitro* material vegetal para la toma de los explantes, obtener cultivos embriogénicos y suspensiones celulares, en el cultivar de plátano 'Navolean'.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de plantas en floración, previamente seleccionadas con buen estado fitosanitario y

nutricional, se seleccionaron hijuelos de tipo "espada" con una altura entre 25 y 30 cm los cuales fueron llevados a condiciones semicontroladas (Fase 0 de la micropropagación). Transcurridos 45 días se eliminaron las partes más externas del cormo y las vainas foliares, hasta obtener secciones de aproximadamente 5 cm de largo y de diámetro, que encierran el ápice vegetativo.

Se realizó una primera desinfección con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 3% durante 20 minutos seguido por tres lavados con agua desionizada estéril durante 3-5 minutos cada uno. En condiciones asépticas (Cabinas de flujo laminar) se redujo el tamaño del material vegetal hasta obtener unos 2-3 cm de alto con una base cuadrada de 1.5 cm aproximadamente, seguido de una segunda desinfección por espacio de 10 minutos.

El establecimiento *in vitro* se realizó en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS), (sales minerales y vitaminas) y suplementado con sacarosa (30 g.l⁻¹), tiamina adicional (1 mg.l⁻¹), 6-BAP (1.13 mg.l⁻¹), AIA (0.88 mg.l⁻¹), pH 5.7 y gelificado con agar (6.0 g.l⁻¹).

La multiplicación *in vitro* de los ápices meristemáticos establecidos como fuente donante de explantes se realizó en el medio de cultivo basal (MS, 1962) (sales y vitaminas), al cual se le adicionó tiamina (1.0 mg.l⁻¹), sacarosa (40 g.l⁻¹), pH 5.7 y gelificado con agar (6.0 g.l⁻¹), las combinaciones de reguladores del crecimiento utilizadas fueron 6-BAP (0; 2.25; 4.50; 6.75 mg.l⁻¹) combinados con y sin AIA a razón de 0.88 mg.l⁻¹. Se utilizaron 30 tubos de ensayo para cada tratamiento, y fue evaluada la proliferación de yemas por explante (coeficiente de multiplicación) frente a los diferentes reguladores del crecimiento.

Posteriormente se realizaron tres ciclos de cultivo en el medio de cultivo P4 para la obtención de los «scalps» (explantes óptimos) según Schoofs (1997).

La inducción de cultivos embriogénicos se realizó a partir de los «scalps», los cuales fueron cuidadosamente cortados de la parte superior de los domos meristemáticos (4-6 mm de diámetro) e incubados en un medio de cultivo constituido por las sales MS (1962) reducidas a la mitad de su concentración, ácido ascórbico (10 mg.l⁻¹), 2,4-D (1.11 mg.l⁻¹), zeatina (0.22 mg.l⁻¹) pH 5.7 y gelificado con Gelrite, 2 g.l⁻¹ (medio ZZ). No se realizaron subcultivos hasta la obtención de agregados embriogénicos. Se evaluó el número y porcentaje de cultivos embriogénicos formados, en los 150 "scalps" utilizados.

El establecimiento de las suspensiones celulares se realizó tomando fracciones de cultivos embriogénicos

las cuales se incubaron en 10 Erlenmeyers de 10 y 25 mL en el medio de cultivo ZZ líquido, respectivamente. Se colocaron en un agitador orbital a 90 rpm, bajo condiciones de oscuridad y temperatura 27 ± 2°C. Los cambios de medio de cultivo se realizaron cada tres y seis días renovando el 50 % del medio de cultivo durante esta primera fase de establecimiento de las suspensiones celulares.

Se evaluó el tiempo de establecidas las suspensiones y posteriormente se multiplicaron las mismas semanalmente manteniendo el 3 % del volumen de células sedimentadas.

Los datos obtenidos fueron procesados mediante una prueba de hipótesis para muestras independientes. La comparación múltiple de medias se realizó según la prueba de Duncan al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transcurridos 25 días de la implantación *in vitro* los ápices adquirieron el grosor adecuado para ser seccionados en dos o cuatro partes, momento en el cual se incubaron en las diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento.

Como se observa en la tabla 1, los mejores medios de cultivo para la multiplicación de los explantes a los 28 días fueron los medios 7 y 8, sin diferencias significativas entre ellos, ni con el medio 6, este último no presentó diferencias significativas con los medios 2, 3, 4 y 5.

A la semana de permanecer los explantes en el medio de cultivo inductor (ZZ sólido) para la formación de callos con estructuras embriogénicas no se observaron cambios visibles, a partir de la segunda semana y hasta la tercera los explantes duplicaron su tamaño. Luego, de la cuarta a la sexta semana, desaparecieron las multiyemas y comenzaron a observarse tejidos nodulares de color blanco – amarillento, los cuales a las 12 semanas se definieron como glóbulos meristemáticos de color amarillo (callo nodular) y aparecieron los primeros embriones somáticos hasta la obtención de masas de embriones similares a las descritas por Escalant *et al.* (1994) y Schoofs (1997).

De 150 "scalps" colocados en el medio de cultivo ZZ sólido, siete formaron cultivos embriogénicos representando un 4.66%. Estos resultados se encuentran dentro de los óptimos en el caso de los bananos y plátanos, si se tiene en consideración que el banano es un cultivo recalcitrante con respecto a la embriogénesis, con respuestas a menudo, extremadamente bajas (menos del 1%), y dependiente del genotipo (Schoofs *et al.*, 1999).

Se establecieron suspensiones celulares embriogénicas utilizando como explante inicial los

embriones somáticos en estado globular obtenidos en el medio ZZ sólido, se observaron agregados celulares sueltos formados por células gigantes, parenquimatosas y estructuras globulares grandes, las cuales fueron eliminadas en las primeras renovaciones de medio.

Con los Erlenmeyers de 10 ml y cambios de medio de cultivo cada tres días el crecimiento celular fue más rápido, valorado por un aumento en el Volumen de Células Sedimentadas. Esto propició el establecimiento de las suspensiones celulares a los 20 días de iniciadas caracterizándose por un gran número de agregados celulares formados por células esféricas, pequeñas, con contenido citoplasmático

denso y en división activa y la proliferación de agregados traslúcidos compuestos por células meristemáticas similares a las descritas por Schoofs (1997) y Grapin *et al.* (1998).

Esto propició el establecimiento de las suspensiones celulares a los 20 días de iniciadas. Por el contrario en los Erlenmeyer de 25 ml el crecimiento celular fue menor, llegándose a establecer las suspensiones con similares características, a partir de los 30 días de iniciadas las mismas.

Después de establecidas las suspensiones celulares se realizó el mantenimiento de las mismas al 3% del Volumen de Células Sedimentadas.

Tabla 1. Coeficientes de multiplicación del cultivar 'Navolean' en medios de cultivo con diferentes combinaciones de 6-BAP y AIA.

Reguladores del crecimiento (6-BAP-AIA) (mg.l ⁻¹)	Coefficiente de multiplicación
Medio – 1 (Sin reguladores)	0.15 c
Medio – 2 (2.25 – 0)	1.00 b
Medio – 3 (4.50 – 0)	1.10 b
Medio – 4 (6.75 – 0)	1.00 b
Medio – 5 (0 – 0.88)	1.09 b
Medio – 6 (2.25 – 0.88)	1.19 ab
Medio – 7 (4.50 – 0.88)	1.65 a
Medio – 8 (6.75 – 0.88)	1.60 a
ES ±	0.06
CV =	22.34%

Medias con letras no comunes difieren entre si según la prueba de Duncan $p < 0.05$

REFERENCIAS

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

Grapin, A, Ortíz JL, Domergue R, Babeau J, Monmarson S, Escalant JV, Teisson C y Cote F (1998) Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flower of *Musa spp.* *InfoMusa* 7: (1) 13-15

Sági, L (2000) Genetic Engineering of Banana for Disease Resistance- Future Possibilities. En: Jones, D.(ed). *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. pp. 465- 515

Schoofs, Hilde (1997) The origin of embryogenic cells in *Musa*. Ph.D.thesis, K.U.Leuven, Belgium. p.257

Schoofs, Hilde, 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 morfológicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *InfoMusa*. 9(2).pp. 3-6