

Multiplicación, histodiferenciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas en plátanos vianda “Navolean” (AAB)

M. Cabrera¹, J. López¹, R. Gómez², N. Montano¹, M. Reyes², D. Reinaldo¹, J.C. Ventura¹, V. Medero¹, Arletys Santos¹, M. García¹, Milagros Basail¹, E. Espinosa¹ *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INVIT, Apartado 6, Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba. e-mail: inivit@enet.cu.

² Instituto de Biotecnología de las Plantas, IBP. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

RESUMEN

El mejor resultado para la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas en el cv. ‘Navolean’ se obtuvo al utilizar una densidad celular del 3.0% del Volumen de Células Sedimentadas. En la etapa de histodiferenciación se logró la mayor formación de embriones somáticos en etapa globular utilizando como densidad 12.0% de volumen final de células en medio de cultivo líquido. Al emplear 0.5 gMF de embriones somáticos durante 30 días de cultivo en el medio de cultivo de maduración, fue posible lograr la maduración de los embriones e incrementar la germinación. Empleando sistemas de inmersión temporal con 0.5 gMF de embriones somáticos maduros se incrementó el valor de germinación a 77.40%.

Palabras clave: embriogénesis somática, inmersión temporal, *Musa*, volumen de células sedimentadas (VCS)

ABSTRACT

The results obtained show that the best cell density for the multiplication of the cell suspensions in the cultivar ‘Navolean’ is 3.0% settled cell volume. In the histo-differentiation phase the greatest formation of somatic embryos in the globular stage was obtained using a density of 12.0% final cell volume in liquid culture medium. The maturation of the embryos and an increase in germination was possible on using 0.5 gFW of somatic embryos during 30 days in the maturation culture medium. Using temporary immersion systems with 0.5 gFW of mature somatic embryos, the germination value was increased to 77.40%.

Key words: *Musa*, settled cell volume (SCV), somatic embryogenesis, temporary immersion

INTRODUCCION

En Cuba las áreas dedicadas al cultivo de plátanos vianda (AAB) se han reemplazado progresivamente, debido a los bajos rendimientos y susceptibilidad a las enfermedades que presentan los mismos, principalmente la “Sigatoka amarilla” (*Mycosphaerella musicola*) y “Sigatoka negra” (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) (Rodríguez, 2000).

La embriogénesis somática en el género *Musa* tiene dos objetivos principales: el desarrollo de técnicas de mayor propagación *in vitro* y un sistema de regeneración a nivel celular útil para la transformación genética e hibridación somática (Georget *et al.*, 2000).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer un sistema eficiente de regeneración *in vitro* de plantas a nivel celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares

Con el objetivo de evaluar la influencia de la densidad celular en la etapa de multiplicación, se realizó el seguimiento de tres densidades, 3.0, 6.0 y 9.0% de Volumen de Células Sedimentadas (VCS), y se utilizó el medio de cultivo ZZI propuesto por Dhed'a *et al.* (1991) constituido por las sales y vitaminas MS, ácido ascórbico 10 mg.l⁻¹, 2,4-D 1.11 mg.l⁻¹, zeatina 0.22 mg.l⁻¹, sacarosa 30 g.l⁻¹ y pH 5.8. Se utilizó la técnica de VCS y cada tres días se midió el crecimiento del volumen celular.

El cultivo se realizó en un agitador orbital, bajo condiciones de luz solar, velocidad de 90 r.p.m. y temperatura de 27 ± 2°C.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete de ajuste de curvas *CURVE EXPERT* 1.3 versión 96-97.

Formación de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido

Se evaluó el efecto de cinco densidades de células, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 y 15.0% de VCS. Para ello se empleó el medio de cultivo RD, propuesto

por Dheda *et al.* (1991) constituido por las sales y vitaminas MS, mioinositol 100 mg.l⁻¹, sacarosa 30 g.l⁻¹ y pH 5.8.

En el conteo del número de embriones somáticos formados, se tomaron y pesaron 100 mg de la masa de embriones formados, cada uno por separado se adicionó en una placa de Petri, que contenía una mezcla de Phytigel – agua, realizándose el conteo a los 45 días de cultivo bajo el microscopio estereoscópico. Las condiciones de cultivo y el análisis de los datos fueron similares al descrito para la multiplicación de las suspensiones celulares.

Maduración de los embriones somáticos

Se evaluaron dos densidades de inóculos 0.5 y 1.0 gMF de peso fresco de embriones somáticos en etapa globular en 30 ml de medio de cultivo de maduración propuesto por Gómez *et al.* (2000) constituido por las sales y vitaminas MS, Biotina 1.0 mg.l⁻¹, 6-BAP 0.5 mg.l⁻¹, AIA 2.0 mg.l⁻¹, sacarosa 45 g.l⁻¹, pH 5.8. Cada 15, 30 y 40 días se tomó una muestra de 250 embriones de cada uno de los Erlenmeyer y se colocaron 50 embriones en cada placa de Petri utilizada como repetición, que contenía medio de cultivo de germinación semisólido propuesto por Gómez *et al.* (2000), para determinar el porcentaje de germinación, emisión de hojas y raíz. Las condiciones de cultivo fueron similares al descrito para la multiplicación de las suspensiones celulares.

El análisis de los datos se procesó mediante técnica no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Germinación de embriones somáticos

Se evaluó el efecto de dos densidades de inóculo 0.5 y 1.0 gMF de embriones somáticos maduros en la germinación, se utilizaron los Sistemas de Inmersión Temporal, RITA citado por Barranco (2000), se adicionaron 200 ml de medio líquido propuesto por Gómez *et al.* (2000) constituido por las sales MS, vitaminas Morel, mioinositol 100 mg.l⁻¹, biotina 0.01 mg.l⁻¹, 6-BAP 0.5 mg.l⁻¹, AIA 2.0 mg.l⁻¹, sacarosa 30 g.l⁻¹, Biobra-6 0.01 mg.l⁻¹, pH 5.8 y a

los 90 días se evaluó el número de embriones que formaron plantas completas.

Los datos fueron analizados mediante una comparación de proporciones con la ayuda del paquete estadístico STATISTIX versión 1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares

De las densidades celulares estudiadas solo las suspensiones celulares multiplicadas con una densidad celular de 3.0% de VCS mostraron una fase de crecimiento exponencial bien definida y continua, en la misma las células fueron jóvenes, biológicamente activas y alcanzaron su máxima tasa de división. A los 18 días de cultivo se produjo el mayor incremento de la biomasa celular con 0.48 ml de VCS. Si se realiza el subcultivo antes de este período, las células se mantendrán siempre en multiplicación continua y sin pasar a la fase lineal. Schoofs *et al.* (1999), obtuvieron en el cultivar 'Williams' (AAA) que los volúmenes celulares establecidos (VCE) de 3.0 y 5.0% fueron superiores al VCE iniciales de 10.0%.

Formación de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido

En medio de cultivo RD₁ líquido, a partir del vigésimo segundo día de cultivo, comenzaron a formarse en la base del Erlenmeyer estructuras arenosas compuestas por proembriones y embriones somáticos en etapa globular. Se obtuvieron los resultados más favorables con densidades entre 9.0 y 15.0% de volumen final de células después de 45 días de cultivo, en la densidad de 12.0% de VCS, se obtuvo el mayor número de embriones somáticos 1584 ± 17.96 por mL de suspensión. En el análisis del ajuste de la curva se pudo determinar que este fue el tratamiento más cercano al punto de máxima respuesta teórica 12.29%, coincidiendo con el pico de la curva (Figura 1).

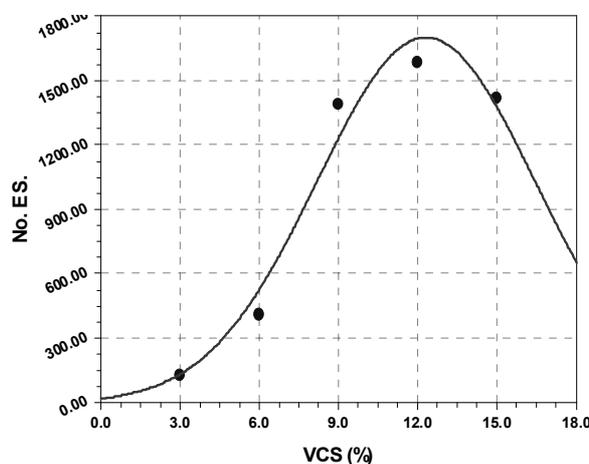


Figura 1. Influencia de la densidad celular (VCS) en la formación de embriones somáticos en el cultivar 'Navolean' en medio de cultivo líquido a los 45 días de cultivo.

Dhed'a *et al.* (1991) en el cultivar 'Bluggoe' (AAB) utilizando suspensiones celulares obtuvieron formación de embriones somáticos en medio de cultivo RD1 líquido, pero no hizo mención al número de embriones somáticos formados, Schoofs *et al.* (1999), utilizando suspensiones celulares con alto poder de regeneración obtuvo de 10^2 a 10^4 embriones somáticos por ml de VCE pero en medio de cultivo RD1 semisólido.

Maduración de los embriones somáticos

Con la densidad de 0.5 gMF y 30 días de cultivo en medio de cultivo de maduración, se obtuvo el más alto porcentaje de germinación (46.89%) con diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento de media más baja (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo en el medio de cultivo de maduración sobre el porcentaje de germinación de embriones somáticos del cultivar Navolean.

Densidad de inóculo	Tiempo de cultivo	Medias	Medias de rango
0.5 gMF	15 Días	27.33	12.33 c
0.5 gMF	30 Días	46.89	49.33 a
0.5 gMF	40 Días	40.22	37.27 ab
1.0 gMF	15 Días	23.78	7.88 c
1.0 gMF	30 Días	32.89	22.83 bc
1.0 gMF	40 Días	39.11	35.33 ab

(a,b,c,) Medias con letras no comunes difieren según Kruskal-Wallis para $P < 0.05$

Dhed'a *et al.* (1991) luego de obtener los embriones somáticos en el cv. 'Bluggoe' (ABB), los mismos fueron pasados a medio de cultivo líquido de maduración durante dos a cuatro semanas y observaron un aumento del tamaño de los embriones.

Germinación de los embriones somáticos

La mejor respuesta con respecto al número de embriones germinados, se logró al inocular 0.5 gMF de embriones somáticos en los sistemas de

inmersión temporal, obteniéndose un 77.40% de germinación (Tabla 2).

Gilliard (1999) en el cultivar híbrido 'FHIA-18' (AAAB) y Barranco (2001) en el cv. 'Gran Enano' (AAA), utilizando el medio de cultivo modificado por Gilliard (1999), con densidad de inóculo de 500 mgMF de embriones en los SIT, han obtenido 85.0 y 104.4% de germinación respectivamente, lo cual confirma los resultados alcanzados en el presente trabajo.

Tabla 2. Efecto de la densidad de inóculo sobre la germinación de embriones somáticos del cultivar Navolean en sistemas de inmersión temporal.

Densidad de inóculo	No. de embriones iniciales	No. de embriones germinados	Germinación (%)
0.5 gMF	525	406	77.40 a
1.0 gMF	1050	634	60.40 b
Control (Semisólido)	200	88	44.21c

*Letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.01$

REFERENCIAS

Barranco, L (2001) Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. FHIA-18) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis presentada en opción al grado científico de Dr. en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. 107 p.

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

Georget, F, Cote F, Domergue R y Ferrière N. (2000) Morphohistological study of different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. Plant Cell Report 19: 748-754

Gilliard, T. 1999. Embriogénesis somática en medios líquidos del cultivar híbrido FHIA 18 (AAAB). Tesis para optar al grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. IBP. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. 72 p.

Gómez, R, Guilliard T, Barranco L y Reyes M. (2000). Embriogénesis somática en medios líquidos maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FIHA-18 (AAAB). Infomusa 9: 12-16

Rodríguez, S (2000) Evaluación y recomendación de clones resistentes o tolerantes a factores adversos de la producción. INIBAP Annual Report 2000: 43-56

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 via embriogénesis somática a partir de ellas. Infomusa 9: 3-6