

Regeneración de plantas vía embriogénesis somática en plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa AAAB*)

Delia Luisa Álvarez-Vázquez^{1*}, Leyanes García-Águila¹, Idalmis Bermúdez-Caraballoso¹, Maritza Reyes¹

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

La embriogénesis somática es considerada como la técnica más eficiente para la propagación masiva de plantas. Este trabajo tuvo como objetivo regenerar plantas *in vitro* de plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa AAAB*) vía embriogénesis somática. A partir de flores masculinas inmaduras se extrajeron los 14 fascículos nodales más cercanos al meristemo floral. A los cinco meses de cultivo se evaluó el número de callos formados con embriogénesis somática de alta frecuencia y se establecieron suspensiones celulares embriogénicas. Para la formación de embriones somáticos se determinó el efecto del tamaño del agregado celular embriogénico (≤ 500 y > 500 μm) y los reguladores del crecimiento. A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos formados en cada tratamiento y se determinó su efecto en la maduración, germinación y conversión de los embriones somáticos. Se obtuvieron 15 callos con embriogénesis somática de alta frecuencia (1.87%). Las suspensiones celulares en la fase de multiplicación estaban compuestas por células esféricas en activa división, agregados celulares heterogéneos e irregulares, translúcidos y no translúcidos. Estos agregados embriogénicos llegaron a ocupar entre 90-95% de la suspensión celular. El mejor tratamiento para la formación, maduración y germinación de los embriones somáticos fue la combinación de un tamaño de agregado celular embriogénico ≤ 500 μm , sin la presencia de reguladores del crecimiento. Las plantas regeneradas por embriogénesis somática alcanzaron alta supervivencia en condiciones de casa de cultivo.

Editora:

Yelenys Alvarado Capó
Instituto de
Biotecnología de las
Plantas, Universidad
Central Marta Abreu de
Las Villas.

Correspondencia:

e-mail: delia@ibp.co.cu

Recibido: 15-09-2022

Aceptado: 08-12-2022

Copyright:

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 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.

Palabras clave: callos embriogénicos, embriones somáticos, plátanos, regeneración de plantas

Plant regeneration via somatic embryogenesis in plantain cv. 'FHIA 04' (*Musa AAAB*)

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is considered the most efficient technique for the mass propagation of plants. This study aimed to regenerate *in vitro* plants of banana cv. 'FHIA 04' (*Musa AAAB*) via somatic embryogenesis. Immature male flowers were used to extract the 14 nodal fascicles closest to the floral meristem. After five months of cultivation, the number of calluses formed with high-frequency somatic embryogenesis was evaluated, and embryogenic cell suspensions were established. For somatic embryo formation, the effect of the size of the embryogenic cell aggregate (≤ 500 and > 500 μm) and growth regulators was determined. After 30 days of cultivation, the number of somatic embryos formed in each treatment was quantified, and their effect on the maturation, germination,

and conversion of somatic embryos was assessed. A total of 15 calluses with high-frequency somatic embryogenesis (1.87%) were obtained. The cell suspensions in the multiplication phase consisted of spherical cells in active division, heterogeneous and irregular cell aggregates, both translucent and non-translucent. These embryogenic aggregates occupied between 90-95% of the cell suspension. The best treatment for the formation, maturation, and germination of somatic embryos was the combination of an embryogenic cell aggregate size of $\leq 500 \mu\text{m}$, without the presence of growth regulators. The plants regenerated via somatic embryogenesis achieved high survival in greenhouse conditions.

Keywords: embryogenic callus, somatic embryos, bananas, plant regeneration

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) se encuentran entre los principales cultivos de las zonas tropicales y subtropicales de América Latina, Asia y África, lugares donde predominan valores de temperaturas y humedad relativa altas. Por sus aportes nutritivos, se ubican entre los principales alimentos y frutas producidas, ambos representan componentes básicos en la alimentación de más de cuatrocientos millones de personas a nivel mundial (FAO, 2020; León-Agatón *et al.*, 2015).

En Cuba, el cultivo de bananos y plátanos constituye un renglón estratégico de elevada prioridad dentro del programa alimentario nacional (Hernández Socorro *et al.*, 2021). En 2021, el área de cultivo alcanzó 111 000 ha, con una producción anual de 860 542 t y un rendimiento agrícola de 10.9 t ha^{-1} (ONEI, 2021).

El plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa* AAAB) fue obtenido por la Federación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), posee un pseudotallo grueso, de color verde rojizo sin manchas o poco manchado, peciolo con banda ancha, robusto y un porte alto. La bellota es de color rojo violáceo, es de buen rendimiento y resistente a las principales plagas que afectan el cultivo. Además, este cultivar tiene gran aceptación en el mercado nacional por la calidad del fruto y por el rendimiento agrícola. Sin embargo, la poca disponibilidad de material vegetal certificado para ser utilizado como semilla, ha limitado que se extienda por todo el país (Álvarez, 1997).

La reproducción convencional en este cultivar presenta varias limitantes, como son tasas de multiplicación clonal muy bajas, desarrollo de frutos partenocárpicos, poliploidía con producción de semillas extremadamente pobre y bajos niveles de fertilidad femenina (Álvarez, 1997). Su multiplicación por métodos biotecnológicos (organogénesis y embriogénesis somática) podría incrementar la disponibilidad de semilla para plantaciones comerciales, con la calidad genética y fitosanitaria que dichos métodos confieren al material vegetal de plantación (Wang *et al.*, 2022).

Sin embargo, la organogénesis es una vía de regeneración que presenta algunas limitantes, dentro de ellas la necesidad de ejecutar un elevado número de operaciones manuales. Además, los bajos coeficientes de multiplicación que aún se obtienen, repercuten directamente en el aumento de los costos de producción (Barranco *et al.*, 2009).

Para atenuar esta situación una de las vías más eficientes para la propagación de plantas es la embriogénesis somática (von Arnold *et al.*, 2008; Smitha *et al.*, 2020). Esta técnica se considera como la más eficiente para la propagación de plantas debido a la posibilidad de automatizar todo el proceso productivo y a los altos índices de multiplicación en cortos períodos de tiempo. Además, de su empleo en el mejoramiento genético (Wang *et al.*, 2022).

En *Musa*, este proceso se ha logrado establecer en cultivares triploides de bananos (AAA) a partir de flores masculinas inmaduras (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 2000; Filippi *et al.*, 2001; Gómez-Kosky *et al.*, 2000 ; Chong *et al.*, 2005 ; Strosse *et al.*, 2006; Pérez-Hernández y Rosell-García, 2008; Namanya *et al.*, 2014; Remakanthan *et al.*, 2014 ; Morais-Lino *et al.*, 2015 ; Uma *et al.*, 2021). Además, en algunos cultivares tetraploides obtenidos por la Federación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), en 'FHIA-18' (*Musa* AAAB) (Gómez-Kosky *et al.*, 2000; Barranco *et al.*, 2009) y 'FHIA-21' (*Musa* AABB) (Daniels *et al.*, 2002; García-Águila *et al.*, 2010). Sin embargo, no existen referencias en la literatura científica internacional sobre protocolos de embriogénesis somática para el cultivar 'FHIA-04'.

A pesar de estos resultados en diferentes cultivares, aún existen limitaciones en el proceso de la embriogénesis somática durante la fase de formación de callo con estructuras embriogénicas, el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas, la formación de embriones somáticos, entre otros. Así también para la posterior germinación de los embriones somáticos, los cuales difieren entre cultivares de bananos y plátanos. Atendiendo a lo anterior no puede considerarse un protocolo común para otros cultivares (Thriveni *et al.*, 2021). Por lo anteriormente planteado la presente investigación tuvo como objetivo regenerar plantas *in vitro* de plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa* AAAB) vía embriogénesis somática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron inflorescencias masculinas inmaduras (pámpanas) de 'FHIA-04' (*Musa* AAAB). Estas se colectaron de plantas adultas en condiciones de campo en la Cooperativa de Créditos y Servicios (CCS) "La Fortaleza", Santo Domingo en la provincia de Villa Clara, Cuba

Condiciones de cultivo in vitro

Las fases de cultivo de células en suspensión, la formación y maduración de los embriones somáticos se realizaron en condiciones de oscuridad constante a 25 ± 2 °C. Para la fase de germinación de los embriones somáticos, los frascos de cultivo se colocaron en cámara de crecimiento con luz solar, 27 ± 2 °C con un período luminoso de aproximadamente 13/11h de luz/oscuridad con un rango de densidad flujo de fotones fotosintéticos (FFF) entre 48.0 y $62.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medido con un Luxómetro Extech 401025 (Extech Instruments, EUA).

Formación de callos con estructuras embriogénicas

Un total de 80 inflorescencias masculinas inmaduras se cortaron a 10 cm de longitud de la última flor femenina emitida, se eliminaron las brácteas envolventes, en condiciones no estériles. Luego estas se transfirieron a la cabina de flujo laminar para su desinfección. Se sumergieron dos veces en etanol 70% (v/v) durante 15 min y posteriormente se enjuagaron con agua desionizada estéril. Bajo un microscopio estereoscópico se extrajeron los 14 fascículos nodales más cercanos al meristemo floral y se colocaron en el medio de cultivo desde el fascículo cinco hasta el 14 (Escalant *et al.*, 1994). A los cinco meses de cultivo se cuantificó el número de callos con embriogénesis somática de alta frecuencia y se calculó el porcentaje de callos con estructuras embriogénicas. Además, se realizó una descripción morfológica de las estructuras formadas para el cultivar objeto de estudio.

Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas

A partir de las estructuras embriogénicas formadas se establecieron suspensiones celulares embriogénicas siguiendo el criterio y el procedimiento descrito por García-Águila *et al.* (2012). El establecimiento se inició a partir de 150 mg de masa fresca (mgMF) de estructuras embriogénicas procedentes de los callos que se seleccionaron en el experimento anterior.

Estas se adicionaron en frascos Erlenmeyers (25 ml de volumen total) que contenían 3.0 ml de medio del cultivo líquido. Se utilizó el medio de cultivo compuesto por sales y vitaminas MS al 100%, 0.5 mg l⁻¹ de biotina, 100 mg l⁻¹ de L-glutamina, 100 mg l⁻¹ de extracto de malta, 3.0 mg l⁻¹ 2,4-D y 45 g l⁻¹ de sacarosa Daniels *et al.* (1991). El pH fue ajustado a 5.3 previo a los 15 minutos de esterilización en autoclave. Los Erlenmeyers se colocaron en un agitador orbital (INFORS HT) a 90 rpm. Se renovó un 50% del medio de cultivo cada 7 días durante las primeras 4 semanas de cultivo y cada 15 días durante las siguientes semanas de cultivo (Strosse *et al.*, 2003). A los tres meses se realizó una descripción morfológica de las suspensiones celulares establecidas a partir de las masas de embriones somáticos obtenidos.

Formación de embriones somáticos

En este ensayo se estudió, el efecto del tamaño del agregado celular embriogénico y los reguladores del crecimiento en la formación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido. Para ello, se utilizaron suspensiones celulares embriogénicas en fase de multiplicación.

Se emplearon cinco recipientes de cultivo de 500 ml de capacidad con cuatro mallas de poliestireno (1 cm²) de tamaño de poro de 50 µm 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. En el momento de tomar la muestra esta se homogenizó con la ayuda de una micropipeta (GILSON), 200 µl de la suspensión celular fueron vertidos sobre cada malla. Se establecieron cuatro tratamientos a partir de la combinación de dos medios de cultivo con 6-bencilamino purina (6-BAP) y ácido indol acético (AIA) y sin reguladores del crecimiento (Dhed'a *et al.*, 1991) y dos tamaños de agregados celulares embriogénicos (≤500 µm y >500 µm) (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos estudiados.

Tratamiento	Tamaño del agregado celular embriogénico	Reguladores del crecimiento (mg l ⁻¹)	
		6-BAP	AIA
1	≤500 μm	0.4	0.3
2	≤500 μm	0	0
3	>500 μm	0.4	0.3
4	>500 μm	0	0

A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos formados en cada malla de poliestireno para todos los tratamientos. Se establecieron 12 repeticiones por tratamiento.

Fases de maduración y germinación de los embriones somáticos

Para el desarrollo de estos ensayos se siguió la metodología propuesta por Gómez-Kosky *et al.* (2000). Se cuantificó a los 30 días de cultivo, el número total de embriones somáticos germinados por recipiente de cultivo y se calculó el porcentaje (%) de ES germinados con malformaciones (germinación parcial, hiperhídricos, en forma de roseta) los que se consideraron fuera de tipo.

Supervivencia *ex vitro*

Con el objetivo de evaluar la respuesta *ex vitro* de la población de plantas obtenidas a partir de los embriones somáticos formados de los experimentos anteriores, se transfirieron a la casa de cultivo un total de 1000 plantas producidas *in vitro* con una altura de 3.5 a 4.0 cm con más de tres hojas expandidas y dos a tres raíces por planta.

Se plantaron en bolsas de poliestireno negro de tamaño 15.0 x 7.5 cm con un sustrato formado por la mezcla de 50% - 50% de materia orgánica (compost de cachaza, residuos de la industria de la caña de azúcar) y estiércol vacuno. Se aplicaron tres riegos por día por 6 minutos por microaspersión. Posterior a los 10 días se fertilizó alterno dos veces por semana con nitrato de potasio y una vez por semana con el bioestimulante VIUSID-Agro® (Catalysis, España) a una disolución de 0.8 ml l⁻¹ y el fertilizante foliar Bayfolan®-Forte (Bayer Crop Science, Alemania) a 10 ml l⁻¹.

Las plantas se cultivaron en casa de cultivo, con una temperatura media durante el día de 30±2 °C y una humedad relativa de 75-70%. La intensidad lumínica osciló entre 224 y 457 μmol m⁻² s⁻¹, la cual se midió con un Luxómetro Extech 401025 (Extech Instruments, EUA).

A los 15 días de cultivo se cuantificó el número de plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia. Se evaluó, además, la presencia de plantas con cambios fenotípicos tales como: la aparición de cambios de color en hojas, pecíolos y pseudotallo según la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997).

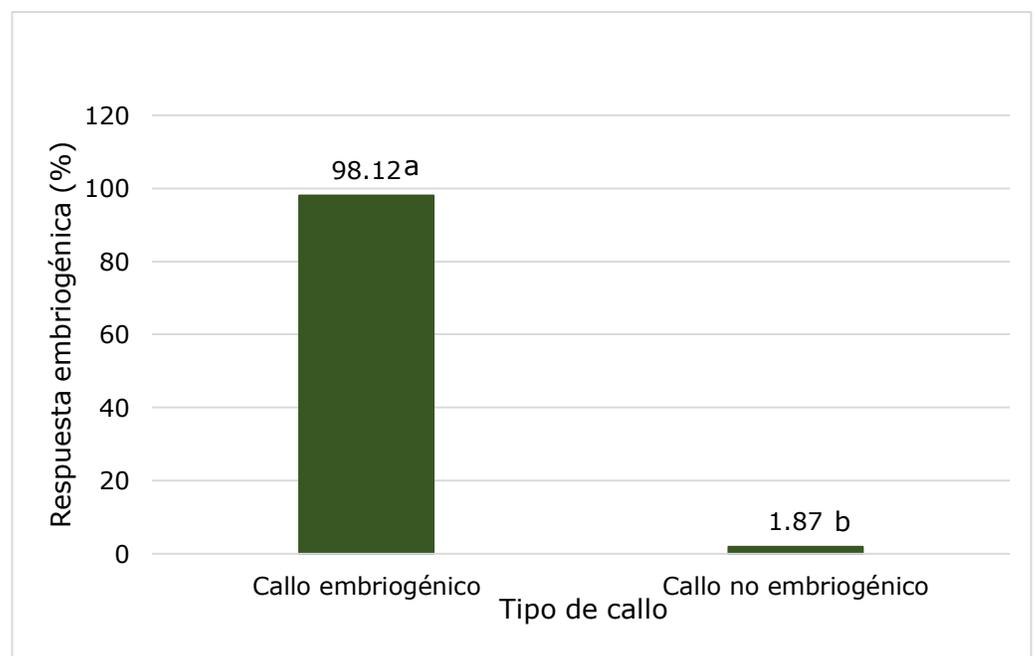
Análisis estadístico

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 23.0 para Windows. Los datos de las variables evaluadas se sometieron a análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas. 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

Formación de callos con estructuras embriogénicas

A partir de los fascículos nodales (flores masculinas inmaduras) cultivados a la oscuridad, se obtuvieron 15 callos con embriogénesis somática de alta frecuencia, para una respuesta embriogénica de 1.87% (Figura 1).



Medias con letras no comunes en cada barra difieren significativamente según prueba de U de Mann-Whitney para $p < 0.05$ ($n=800$)

Figura 1. Respuesta embriogénica de plátano cv. 'FHIA-04' (*Musa AAAB*) a partir del establecimiento de flores masculinas inmaduras, a los cinco meses de cultivo.

Desde el punto de vista morfológico, la formación de callos con estructuras embriogénicas se desarrolló de forma similar a otros genotipos de Musáceas referidos en la literatura científica. A las cuatro semanas de cultivo, en la base de los explantes se observó el fenómeno de la oxidación fenólica, tomando estos una coloración marrón. Además, se apreció la formación de glóbulos de color amarillo

con un crecimiento desordenado. El fenómeno anteriormente descrito, está relacionado con la actividad de enzimas como las polifenoloxidasas y tirosinasas, las cuales se activan o se producen en respuesta a daños en los tejidos, como los generados durante el proceso de preparación de los explantes para su cultivo *in vitro* (Villegas *et al.*, 2008). A los cinco meses de cultivo en los callos con embriogénesis somática de alta frecuencia comenzaron a ser visibles grupos de embriones somáticos en etapa globular (Figura 2).



Figura 2. Embriogénesis somática de alta frecuencia obtenida a partir de callos con cinco meses de cultivo en plátano cv. 'FHIA-04' (*Musa* AAAB).

Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas

Las suspensiones celulares en la fase de multiplicación estaban compuestas por un gran número de células esféricas en activa división y agregados celulares heterogéneos e irregulares, translúcidos y no translúcidos. Las características celulares anteriormente mencionadas se consideran como un indicativo de la condición embriogénica de las suspensiones celulares (Smitha *et al.*, 2020).

Con la observación periódica bajo microscopio óptico de las suspensiones celulares se comprobó que tuvieron cambios en su composición con predominio de agregados celulares y una disminución de la cantidad de células aisladas y parenquimatosas a medida que se fueron realizando los subcultivos. Estos agregados embriogénicos llegaron a ocupar entre 90-95% de la suspensión celular, su tamaño varió entre 80-300 μm y se formó una suspensión celular homogénea (Figura 3).

Este resultado constituye el primer informe en este cultivar de plátano hasta el momento, tomando en cuenta la literatura científica nacional e internacional consultada.

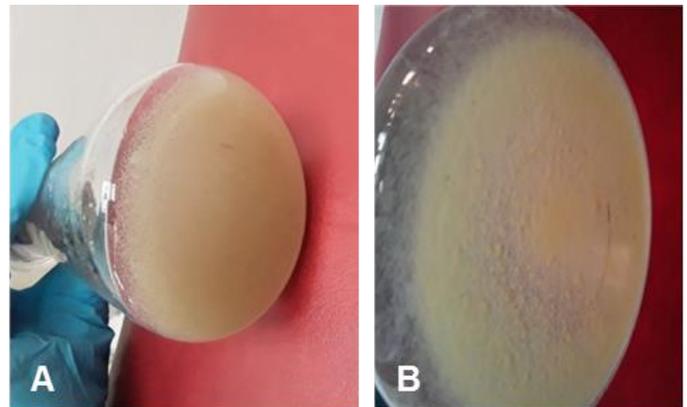


Figura 3. Suspensiones celulares embriogénicas de plátano cv. 'FHIA-04' (*Musa AAAB*) en fase de multiplicación (A, B) a los tres meses de cultivo.

Formación de embriones somáticos

El mejor tratamiento para la formación de los embriones somáticos fue la combinación de un tamaño de agregado celular embriogénico $\leq 500 \mu\text{m}$ sin la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo propuesto por Dhed'a *et al.* (1991). Este presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del tamaño del agregado celular embriogénico y el medio de cultivo sobre la formación de embriones somáticos de plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa AAAB*), a los 30 días de cultivo.

Tamaño del agregado celular embriogénico	Reguladores del crecimiento (mg l^{-1})	Nº de embriones somáticos formados por malla
$\leq 500 \mu\text{m}$	0.4 6 BAP + 0.3 AIA	1500.0 c
$\leq 500 \mu\text{m}$	0	2944.0 a
$> 500 \mu\text{m}$	0.4 6 BAP + 0.3 AIA	900.0 d
$> 500 \mu\text{m}$	0	1888.0 b

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren significativamente según las pruebas H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney para $p < 0.05$ ($n=12$)

Existió una tendencia a una mayor formación de embriones somáticos en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. Con un tamaño del agregado celular embriogénico menor ($\leq 500 \mu\text{m}$), se logró el mayor número de embriones somáticos formados por malla. Según señalaron Neumann *et al.* (2020) el cultivo de células durante 48 a 62 h en un medio de cultivo con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es suficiente para inducir el desarrollo de los embriones somáticos, sobre todo en especies monocotiledóneas.

Por otro lado, el tamizado de las suspensiones celulares tuvo un efecto en la formación de los embriones somáticos. Hasta la fecha en *Musa*, no se encontraron trabajos publicados donde se evalúe el efecto del tamizado o el tamaño de los agregados celulares embriogénicos en la formación de los embriones somáticos. Además, con los resultados de la presente investigación se logró una mayor sincronización del cultivo celular en suspensión.

Los resultados en este cultivar de plátano apoyan lo informado por Strosse *et al.* (2006) para diferentes cultivares de *Musa* diploide y triploides (AA, AAA, AAB, ABB) con buenos resultados en la formación de embriones somáticos a partir de cultivos de células en suspensión. Igualmente, los señalados por Morais-Lino *et al.* (2015) en los cultivares 'Grande naine' (AAA) y 'Tropical' (AAAB) donde el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento formó igual cantidad de embriones somáticos que los tratamientos con una mezcla de diferentes concentraciones de 6-BAP y AIA sin diferencias significativas.

Sin embargo, los resultados alcanzados en la presente investigación fueron contrarios a los informados por Bieberach (1995), Côte *et al.* (1996), Chong *et al.* (2005), Uma *et al.* (2021) en diferentes cultivares triploides de *Musa* y en los tetraploides de la FHIA, 'FHIA-18' (Gómez-Kosky *et al.*, 2000; Gómez-Kosky *et al.*, 2002) y 'FHIA-21' (Daniels *et al.*, 2002; García-Águila *et al.*, 2010). Todos estos autores emplearon el medio de cultivo propuesto por Bieberach (1995) el cual estaba compuesto por una mezcla de reguladores del crecimiento como zeatina, ácido naftalenacético (ANA), isopenilaminopurina (Zip) y Kinetina.

Maduración y germinación de embriones somáticos

Los embriones somáticos en maduración a los 30 días de cultivo iniciaron el proceso de germinación a pesar de no estar en el medio de cultivo para tal fin (Figura 4). Este aspecto fue observado en mayor porcentaje en el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento y con el menor tamaño de agregado celular.

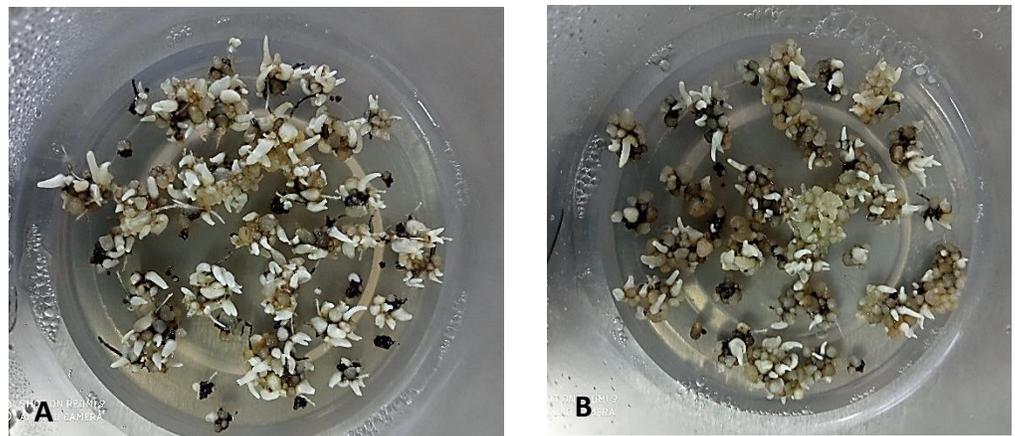


Figura 4. Aspecto morfológico de embriones somáticos pre-germinados de plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa* AAAB), a los 30 días de cultivo. (A) Agregados celulares $\leq 500 \mu\text{m}$ y (B) Agregados celulares $> 500 \mu\text{m}$.

El mayor número de embriones germinados se alcanzó en el tratamiento 2 (agregados celulares embriogénicos $\leq 500 \mu\text{m}$) y la formación de estos sobre

medio de cultivo propuesto por Dhed'a *et al.* (1991), con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del tamaño del agregado celular embriogénico y la adición de reguladores del crecimiento al medio de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa* AAAB), a los 30 días de cultivo.

Tamaño del agregado celular embriogénico	Reguladores del crecimiento (mg l ⁻¹)	Nº de embriones somáticos germinados por frasco de cultivo	Porcentaje (%) de ES germinados fuera de tipo
≤500µm	0.4 6 BAP + 0.3 AIA	137 b	22.6
≤500µm	0	245 a	1.2
>500µm	0.4 6 BAP + 0.3 AIA	62 d	22.5
>500µm	0	75 c	10.6

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren significativamente según prueba H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney para p<0.05 (n=600)

El 97% de los embriones somáticos formados a partir de agregados celulares menores (≤500 µm) regeneraron plantas con pseudotallo definido, dos hojas expandidas y presencia de raíces. Sin embargo, en aquellos formados a partir de agregados >500 µm, se observaron mayor cantidad de embriones con germinación parcial, malformaciones en forma de rosetas, presencia de una sola hoja, sin el pseudotallo definido y engrosamiento del embrión sin germinar.

Este resultado pudo deberse a diferencias en los niveles endógenos de reguladores del crecimiento en los embriones somáticos formados en ambos medios de cultivo. Según Jiménez y Thomas (2006) la interacción entre los niveles endógenos y exógenos de los reguladores del crecimiento tiene un efecto en la posterior germinación de los embriones somáticos. Al respecto, estos autores sugirieron, que la actividad celular durante la germinación de los embriones somáticos es controlada por varios factores internos. Entre los más importantes estuvieron: diferencias en los niveles de reguladores del crecimiento endógenos en el explante o la interacción entre los niveles endógenos y exógenos de estos en las diferentes fuentes de explantes, modo de absorción de los nutrientes y reguladores de crecimiento (exógenos), capacidad regenerativa del explante inicial, edad del tejido, calidad y concentración del agente gelificante y competencia de las células del explante para la morfogénesis *in vitro*. Esta información puede ayudar a argumentar una posible explicación a los resultados de la presente investigación.

Supervivencia ex vitro

A los 15 días de iniciada esta fase, se logró 98.5% de supervivencia de las plantas. Se observaron plantas con variaciones morfológicas como la presencia de una banda fina de color rojo en el pecíolo y el pseudotallo de color verde brillante con algunas manchas claras que según Álvarez (1997) son características fenotípicas

del cultivar, que desaparecen a medida que aumenta la edad de la planta (Figura 5). También, Gómez-Kosky *et al.* (2006) informaron valores similares a los de la presente investigación en el cultivar 'FHIA-18' (AAAB) en cuanto al porcentaje de supervivencia (98.5%).



Figura 5. Plantas de plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa* AAAB), a los 60 días de cultivo *ex vitro*.

A partir de los resultados, se desarrolló un protocolo de trabajo mediante el cual se pueden obtener plantas vía embriogénesis somática de plátano cv. 'FHIA-04' (AAAB). Dicho protocolo fue ajustado para su uso comercial como una vía de obtención de semilla de alta calidad genética y fitosanitaria. Además, puede tener utilidad en la conservación de germoplasma, el mejoramiento genético a través de la mutagénesis y la transgénesis vegetal, así como los procesos de biotización *in vitro* para dar valor agregado a la semilla biotecnológica. Además, esta metodología podría ser aplicada a otros cultivares de interés en el género *Musa*.

CONCLUSIONES

Mediante embriogénesis somática se pueden regenerar plantas en el cultivar de plátano 'FHIA 04' (*Musa* AAAB) con alta supervivencia y mínimos cambios fenotípicos, lo cual evidencia la viabilidad del protocolo propuesto para la propagación *in vitro* en este cultivar. A través del protocolo desarrollado se obtiene una frecuencia del 1.87% de callos con capacidad embriogénica. Con el empleo del medio de cultivo sin reguladores del crecimiento, junto con un tamaño de agregado celular embriogénico $\leq 500 \mu\text{m}$, se favorece significativamente la formación, maduración y germinación de los embriones somáticos.

REFERENCIAS

Álvarez JM A (1997) Introducción, evaluación, multiplicación y disseminación de los híbridos FHIA en Cuba. Infomusa 6: 10-14

Barranco LA, Gómez-Kosky R, Reyes M, Posada L, Freire M, Herrera I (2009) Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano FHIA-18 (*Musa* spp. AAAB). Revista Colombiana de Biotecnología 2: 29-36

Bieberach C (1995) Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* spp. Tesis presentada en opción al grado científico de Magister Scientiae, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Chong B, Gómez R, Reyes M, Bermúdez-Caraballosa I, Gallardo J (2005) New methodology for the establishment of cell suspensions of Grand Naine (AAA). *InfoMusa* 14: 13-17

Côte FX, Domergue R, Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C, Escalant JV (1996) Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. 'Grande Naine'. *Physiologia Plantarum* 97: 285-290

Daniels D, Gómez-Kosky R, Vega M (2002) Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid 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, 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

FAOSTAT (2020) Food and agriculture organization of the United Nations FAO. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/> Consultado 15/05/2022

Filippi SB, Appezzato-da-Gloria B, Martinelli RAP (2001) Morphological variation of somatic embryos obtained from banana inflorescences. *Scientia Agricola* 58(4): 711-716

García-Águila L, Gómez-Kosky R, Alvarado CY, Sarría ZS y Reyes M (2010) Effect of inoculum density on formation and morphology of plantain somatic embryos (*Musa* spp. AAAB, cv. Hybrid FHIA-21). *Revista Colombiana de Biotecnología* 12(2): 240-247

García-Águila L, Alvarado-Capó Y, Gómez-Kosky R, Sarría Z, Chong PB, Reyes M, Pérez B, Concepción A, Mollineda Á (2012) Análisis del contenido de nutrientes minerales durante la formación y maduración de embriones somáticos de FHIA-21 (*Musa* AAAB). *Biotecnología Vegetal* 12(1): 33-40

Gómez-Kosky GR, Gilliard T, Barranco LA, Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido 'FHIA-18' (AAAB). *Infomusa* 9(1): 12-16

Gómez-Kosky R, Silva MF, Pérez LP, Gilliard T, Martínez FB, Vega MR, Milian MC, Mendonza EQ (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 68: 21-26

Gómez-Kosky R, Barranco La, Pérez BC, Daniels D, Reyes Vega M, de Feria M (2006) Trueness-to-type and yield components of the banana hybrid cultivar

FHIA-18 plants regenerated via somatic embryogenesis in a bioreactor. *Euphytica* (150): 63-68

Grabin A, Ortíz JL, Lescot T, Ferrière N, Côte FX (2000) Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61: 237-244

Hernández Socorro MA, Delgado Oramas BP, Miranda Cabrera I, Suris Campo M, Rodríguez Hernández MG (2021) Characterization of farms and farmers associated with banana/plantain production in selected zones of Cuba. *Agricultura Tropical* (45): 54

Jiménez VM, Thomas C (2006) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. En: Mujib A, Samaj J (Eds). *Plant Cell Monographs*, pp.103-118. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

León-Agatón L, Mejía-Gutierrez LF, Montes-Ramírez LM (2015) Caracterización socioeconómica y tecnológica de la producción del plátano en el bajo accidente del departamento de caldas. *Luna Azul* (41): 184-200

Morais-Lino LS, Santos-Serejo JA, Perito EA, Ferreira JR de S, Pasqual M, de Oliveira SS (2015) Somatic embryogenesis, cell suspension, and genetic stability of banana cultivars. *In Vitro Cell Dev Biol -Plant* 52: 99-106; doi: org/10.1007/s11627-015-9729-2

Namanya P, Mutumba G, Magambo SM, Tushemereirwe W (2014) Developing a cell suspension system for *Musa*-AAA-EA cv. 'Nakyatengu': a critical step for genetic improvement of Matooke East African Highland bananas. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 50: 442-450

Neumann KH, Kumar A, Imani J (2020) Phytohormones and Growth Regulators. *Plant Cell and Tissue Culture* 3: 309-319

ONEI (2021) Anuario estadístico de Cuba. Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca. Disponible en: www.onei.cu.pdf. Consultado 15/10/2022

Pérez-Hernández JB, Rosell-García P (2008) Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. 'Dwarf Cavendish') male flowers. *Plant Cell Rep* 27: 965-971

Remakanthan A, Menon TG, Soniya EV (2014) Somatic embryogenesis in banana (*Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine): effect of explant and culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 50: 127-136

Sandoval JA, Pérez L, Côte F (1997) Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano). *Corbana* 22(48): 41-60

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204

Smitha PD, Binoy K, Ashalatha R, Nair S (2020) Enhanced Secondary Somatic Embryogenesis in Suspension Culture of Four Diploid Banana Cultivars from Kerala. *International Journal of Fruit Science* 20 (S2): 617-626

Strosse H, Schoofs H, Panis B, Andre E, Reyniers K, Swennen R (2006) Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Sci* 170: 104-112; doi: 10.1016/j.plantsci.2005.08.007

Thriveni V, Viswanath M, Roy A (2021) Micropropagation in Banana: a review the *Pharma Innovation Journal TPI* 10(8): 966-974

Uma S, Karthic R, Kalpana S, Backiyarani S, Kumaravel M, Saranya S, Durai P (2021) An efficient embryogenic cell suspension culture system through secondary somatic embryogenesis and regeneration of true-to-type plants in banana cv. Sabri (silk subgroup AAB). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 155(1): 313-322

Villegas F, Giménez C, Vilchez J, Moreno M, Sandoval L, Colmenares M (2008) Oxidación en la inducción de la embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras de Gran Enano (*Musa* AAA). *Rev Fac Agron* 25(3): 21-28

von Arnold S (2008) Somatic embryogenesis. En: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (Eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*, pp. 335-354. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

Wang J, Gan S, Zheng Y, Jin Z, Cheng Y, Liu J (2022) Banana somatic embryogenesis and biotechnological application. *Tropical Plants* 1: 12-17; doi: org/10.48130/TP-2022-0012

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todos mis compañeros de trabajo por su apoyo, colaboración y dedicación constante. Su esfuerzo y compromiso han sido fundamentales para la realización de este proyecto. Este logro es el resultado del trabajo en equipo y la pasión compartida por lo que hacemos. ¡Gracias por su invaluable contribución!

Financiamientos: Este trabajo forma parte del proyecto nacional P131LH001.52: Propuesta de cultivares de *Musa* spp. tolerantes a factores bióticos y abióticos obtenidos por nuevos métodos biotecnológicos para el desarrollo agrícola local. Los autores agradecen la contribución financiera del programa Nacional de Alimentos y su Agroindustria en la realización de esta investigación.

Conflicto de interés: Los autores no declaran conflictos de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización LGA, IBC, DLAV, Análisis formal LGA, IBC, DLAV, Investigación LGA, IBC, DLAV, MRV, Metodología LGA, IBC, Escritura: Primera redacción DLAV, Escritura; Revisión y Edición LGA, IBC, DLAV.

Disponibilidad de datos: Los datos del estudio se presentan en el artículo. Para otras consultas dirigirse al autor para correspondencia.

Delia Luisa Álvarez-Vázquez, <https://orcid.org/0000-0002-8186-9001>

Leyanes García-Águila, <https://orcid.org/0000-0002-9838-5505>

Idalmis Bermúdez-Caraballosa, <https://orcid.org/0000-0002-6991-480X>

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

Cómo citar: Álvarez-Vázquez DL, García-Águila L, Bermúdez-Caraballosa I, Reyes-Vega M (2023) Regeneración de plantas vía embriogénesis somática en plátano cv. 'FHIA 04' (*Musa AAAB*). *Biología Vegetal* 22: 230115