

Empleo Sistemas de Inmersión Temporal en la multiplicación y germinación de embriones somáticos de banano cultivar Gran Enano (AAA) y papaya var. Maradol Rojo

Laisyn Posada Pérez*, Rafael Gómez Kosky y Maritza Reyes. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: laisyn@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN

El método consistió en sembrar cultivos embriogénicos en Sistemas de Filtración "Sartorius" autoclaveables de 250 ml de capacidad. Se emplearon densidades de inóculo inicial que variaron en dependencia del cultivo (250 mg para banano y grupos de 10 a 12 embriones somáticos en el caso de la papaya). Se estudiaron dos tipos de medios de cultivos para la multiplicación de los embriones, para el banano, el medio de cultivo MS modificado y suplementado con Picloram (2 mg.l⁻¹) y el MS modificado con la combinación de 6 BAP y AIA. Para los embriones de papaya se empleó el medio de cultivo MS modificado con dos concentraciones de 2,4-D (1 y 2 mg.l⁻¹). La frecuencia de inmersión fue de tres veces al día durante un minuto. Para la germinación, el medio de cultivo de multiplicación fue sustituido por el medio de cultivo MS suplementado con 0.5 mg.l⁻¹ de 6 BAP, 2 mg.l⁻¹ de AIA, sacarosa 3% para el caso del banano, estudiando dos concentraciones de inóculo 500 y 1 000 mg.l⁻¹ y para papaya el medio de cultivo MS modificado con 0.5 mg.l⁻¹ de 6 BAP, 0.01 mg.l⁻¹ de Biobras-6 (análogo de brasinoesteroide), 0.6 mg.l⁻¹ de riboflavina y sacarosa 2%. Para el banano se lograron los mejores resultados en el medio de cultivo MS modificado sin Picloram obteniendo al cabo de los dos meses tasas de multiplicación 20 veces superiores al medio de cultivo con esta auxina. Al cabo de los 45 días se alcanzaron valores de germinación entre 70-82%. En la papaya fue posible multiplicar los embriones somáticos logrando al cabo de los 45 días coeficientes de multiplicación de 40 en el medio de cultivo suplementado con 1 mg.l⁻¹ de 2,4-D y una germinación del 87%.

Palabras clave: auxina, *Carica papaya*, cultivo de tejidos, embriogénesis somática, medio de cultivo líquido, *Musa*

ABSTRACT

The method consisted of sowing embryogenic culture in Filtration Systems "Sartorius" autoclaveable of 250 ml of capacity. Different densities inoculum that varied in dependency of the culture were used (250 mg for banana and groups of 10 to 12 somatic embryos in the case of papaya). In this case two types of culture medium for the multiplication of the embryos were studied. For the banana, the modified, MS medium with Picloram 2 mg.l⁻¹ and the modified MS with the combination of 6 BAP and AIA, and for the papaya embryos the modified MS medium with two concentrations of 2,4-D (1 and 2 mg.l⁻¹). The frequency was of three times a day during a minute. For the germination, the multiplication culture medium was modified by the MS supplemented with 0.5 mg.l⁻¹ of 6 BAP, 2 mg.l⁻¹ of AIA, sucrose 3% for banana, studying two concentrations of inoculum 500 and 1 000 mg.l⁻¹ and for papaya the modified MS with 0.5 mg.l⁻¹ of 6 BAP, 0.01 mg.l⁻¹ of Biobras-6 (an equivalent of brassinosteroid) 0.6 mg.l⁻¹ of riboflavin and sucrose 2%. As a result for the banana the best results were achieved in the modified MS without Picloram, obtaining after two months, multiplication rates twenty times higher than in the culture medium containing this auxin. Germination values between 70-82% were achieved after three months. In papaya was possible to multiply the somatic embryos obtaining, after 45 days multiplication coefficients of forty in the culture medium with 1 mg.l⁻¹ of 2,4-D and 87% of germination.

Key words: auxin, *Carica papaya*, liquid medium, *Musa*, somatic embryogenesis, tissue culture

INTRODUCCIÓN

Desde hace más de 120 años se ha empleado la técnica del cultivo de tejidos en investigaciones sobre fisiología vegetal. En 1902 Haberlandt citado por Cabasson *et al.* (1997) postuló el principio de la totipotencia que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro*. Este principio plantea y así se ha demostrado que todas las células de las plantas tienen la

información genética para formar un nuevo individuo. El problema a resolver para poder aprovechar esta potencialidad era desarrollar los medios y las técnicas del cultivo *in vitro*.

Contar con un sistema eficiente de regeneración de plantas, a partir de embriones somáticos es un requisito indispensable para el desarrollo de sistemas de transformación genética y una vía futura de propagación masiva en muchas especies

de plantas. La embriogénesis somática es una de las formas de regeneración que debe sustituir en los próximos años la micropropagación tradicional (Gómez, 1998).

El uso del medio de cultivo líquido tiene varias ventajas y es considerado una técnica ideal para la producción a gran escala porque reduce las manipulaciones y simplifica el cambio de medio de cultivo. Este método fue desarrollado por Alvard *et al.* (1993) para la micropropagación de bananos y plátanos y adaptado para el cultivo de embriones somáticos por Escalant *et al.* (1994). Aitken-Chistie y Jones (1987) también usaron un tipo de sistema de inmersión temporal para la propagación del *Pinus*, y han dado resultados exitosos en la micropropagación de *Hevea brasiliensis* por microcortes o embriogénesis somática después de una considerable reducción del tiempo de inmersión (Alvard *et al.* 1993), además de otras especies de plantas (Etienne y Berthouly, 2002).

Tomando en cuenta lo anterior es que se propone como objetivo del presente trabajo:

Estudiar condiciones de cultivo para el empleo de Sistemas de Inmersión Temporal en la multiplicación *in vitro* y regeneración de plantas a partir de embriones somáticos en banano y papaya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del aparato

El recipiente utilizado fue hecho a partir de una unidad de filtración de 250 ml, marca "Sartorius", autoclaveable. La modificación realizada fue conectando los compartimientos de arriba y de abajo con un pequeño tubo de vidrio y colocando una membrana circular de porosidad calibrada (200 micrómetros) al fondo del compartimiento superior. Los embriones somáticos se colocaron en este compartimiento y el medio de cultivo en estado líquido en el inferior.

Con el empleo de una pequeña bomba de aire de laboratorio, se produjo la presión que hizo subir al líquido a través del tubo y vino a sumergir los embriones somáticos en el recipiente de arriba. Cuando la presión de aire cesó el medio de cultivo líquido volvió al compartimiento inferior por gravedad. La frecuencia de inmersión fue de tres veces al día durante un tiempo de un minuto.

El cultivo embriogénico fue ubicado en la parte superior del frasco, con una densidad de inóculo de 250 mg de peso fresco de embriones somáticos en etapa globular del cultivar de banano Gran Enano (*Musa AAA* subgrupo Cavendish) obtenido según metodología propuesta por

Escalant *et al.* (1994). Para la papaya variedad Maradol Rojo se utilizaron de 10-12 embriones somáticos que tenían un subcultivo en medio de cultivo de multiplicación secundaria de embriones en estado semisólido según Posada (1995).

Condiciones de Cultivo

Todos los Sistemas de Inmersión Temporal fueron colocados a la luz artificial empleando lámparas fluorescentes, con fotoperíodo de 12 horas luz, intensidad luminosa de $100 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y una temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. En los dos cultivos se usaron cinco recipientes como repeticiones por tratamientos. Los cambios de medio de cultivo a los sistemas se realizaron cada 15 días y este fue total.

Las evaluaciones se realizaron durante 12 semanas para el banano, y se determinó el aumento de peso fresco semanalmente de las masas de embriones somáticos y para la papaya mediante el conteo durante seis semanas del número de embriones somáticos formados.

Multiplicación Repetitiva

Fueron estudiados dos tipos de medios de cultivo para la multiplicación secundaria de los embriones somáticos en banano. El medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) modificado y suplementado con picloram ($2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) propuesto por Bieberach (1995) y el medio de cultivo MS modificado con la combinación de 6 BAP ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y AIA ($1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Para los embriones somáticos de papaya se estudió el medio de cultivo MS modificado con dos concentraciones de 2,4-D (1 y $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). El pH fue ajustado a 5.8, antes del autoclaveado del medio de cultivo.

Germinación

Para el banano se empleó el medio de cultivo propuesto por Marroquín (1991) compuesto por las sales MS, suplementadas con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 6 BAP, $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIA, sacarosa 3% y pH 5.8 antes del autoclaveado. En base a experimentos preliminares (resultados no mostrados) se asumió que el peso fresco de un embrión somático de banano en ese momento del proceso de embriogénesis fue de 0.5 mg promedio, lo que permitió determinar la cantidad de embriones somáticos en un peso fresco de 500 y 1 000 mg.

Para la papaya se usó el medio de cultivo compuesto por las sales MS, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 6 BAP, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Biobras-6 (análogo de brasinoesteroide), $0.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de rivoflavina, sacarosa 2% y pH 5.8 antes del autoclaveado.

La frecuencia y tiempo de inmersión fueron iguales a los utilizados en las etapas de multiplicación. Para cuantificar la germinación se realizaron conteos del número de embriones somáticos iniciales y los que finalmente formaron plantas *in vitro* a los 45 y 30 días para banano y papaya respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Multiplicación repetitiva

El medio de cultivo MS modificado con 6 BAP (0.5 mg.l^{-1}) y AIA (1 mg.l^{-1}) tuvo un comportamiento superior al medio de cultivo propuesto por Bieberach (1995), para la multiplicación de embriones somáticos de banano en los Sistemas de Inmersión Temporal (Figura 1), alcanzando a las siete semanas de cultivo 12.5 g de peso fresco de embriones somáticos en etapa globular del cultivar Gran Enano. Este medio de cultivo suplementado con ácido indolacético (AIA) como auxina, por primera vez utilizado para la multiplicación de embriones somáticos de bananos, tiene la ventaja que permitió alcanzar mejores resultados que al emplear picloram en el medio de cultivo de multiplicación, evitando así los posibles cambios genéticos que el uso de esta auxina más potente pudiera provocar una vez

germinadas las plantas. El aumento de peso fresco fue de 40 veces para el medio de cultivo con picloram y 70 veces al utilizar MS suplementado con 6-bencilaminopurina y ácido indolacético en el mismo período de tiempo.

En la figura 2 se muestran los resultados para el caso de la multiplicación de los embriones de papaya. El medio de cultivo MS suplementado con 1 mg.l^{-1} de 2,4-D permitió lograr un aumento de las tasas de multiplicación con valores mucho más altos que al utilizar la concentración de 2 mg.l^{-1} de 2,4-D. El aumento del coeficiente de multiplicación fue de 40 veces para la concentración de 1 mg.l^{-1} contra 19 veces para la mayor concentración de 2,4-D. En la literatura consultada se señala el empleo de bajas concentraciones de auxina para lograr una embriogénesis somática repetitiva según autores como Merkler *et al.* (1995), los cuales apoyan los resultados alcanzados.

Los resultados en banano y papaya en los Sistemas de Inmersión Temporal coincidieron con los referenciados por Etienne *et al.* (1997), pero en la especie *Hevea brasiliensis* (caucho). Estos autores empleando los recipientes RITA lograron la multiplicación secundaria de los embriones somáticos entre tres y cuatro veces mayor, que

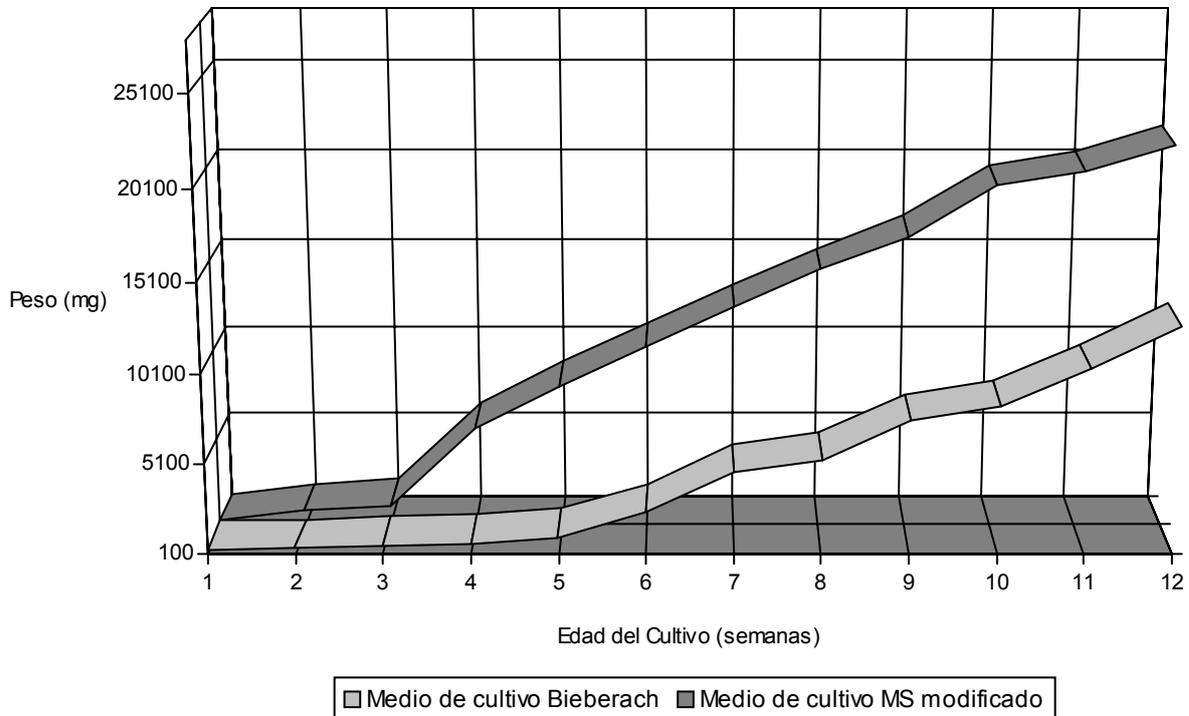


Figura 1. Influencia del medio de cultivo en el incremento del peso fresco durante la multiplicación secundaria de los embriones somáticos de banano en Sistemas de Inmersión Temporal. Cultivar Gran Enano (AAA).

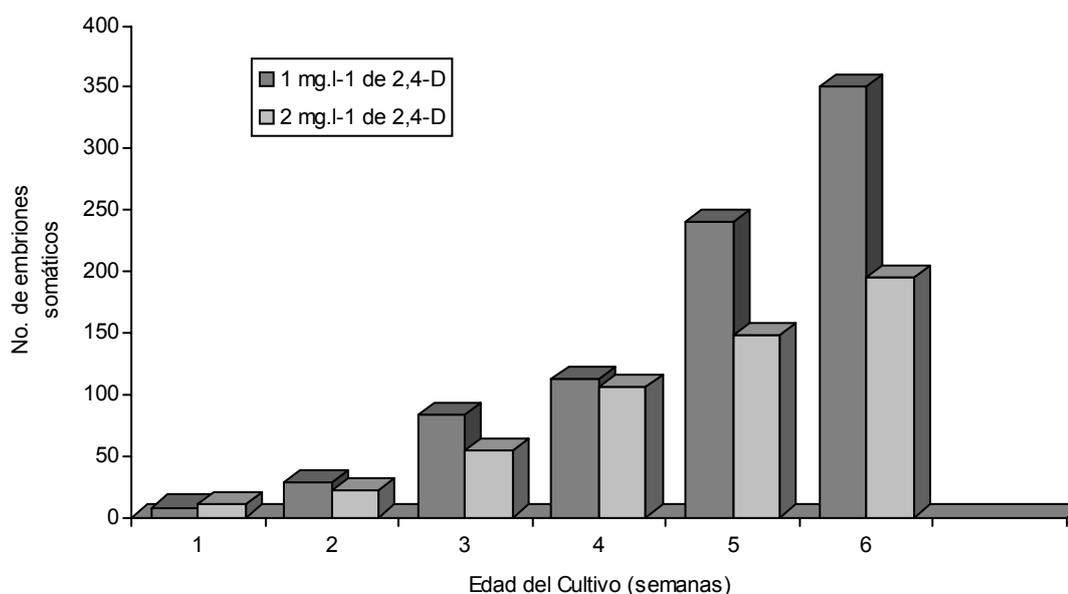


Figura 2. Efecto de la concentración de 2,4-D en la multiplicación secundaria de los embriones somáticos de papaya, en el Sistema de Inmersión Temporal. Variedad Maradol Rojo.

Germinación

En el banano cultivar Gran Enano la germinación se inició a partir del primer mes de cultivo. A los 45 días fue posible obtener mayor cantidad de plantas empleando como inóculo un peso fresco inicial de 500

mg de embriones somáticos, que al colocar 1 000 mg (Tabla 1) en el medio de cultivo propuesto por Marroquín (1991). Esto pudiera ser debido a la competencia por los nutrientes que se establece al emplear grandes cantidades de embriones somáticos en un recipiente con capacidad para 250 ml.

Tabla 1. Efecto de la densidad de inóculo inicial sobre la germinación en plantas de los embriones somáticos del cv. Gran Enano en el Sistema de Inmersión Temporal. A los 45 días de cultivo.

Peso Inicial (mg)	No. E.Somáticos (E.S)	No. E.S Germinados	% Germinación
500	1000	820	82.0
1000	2000	410	20.5

Un estudio similar conducido por Escalant *et al.* (1994) obtuvo resultados comparables con las tasas de germinación de los embriones somáticos alcanzados en el presente trabajo. También Etienne *et al.* (1999) obtuvieron altos porcentajes de germinación (70-80%) de los embriones somáticos en los sistemas RITA, pero en el café (*Coffea arabica*).

En el caso del cultivo de la papaya a los 30 días de cultivo se obtuvo un 87% de germinación con el uso del medio de cultivo propuesto por Posada (1995). Se demostró que es posible en los sistemas de inmersión temporal lograr la germinación en planta completa, también en este cultivo, lo cual no ocurre al colocar los embriones somáticos de papaya a germinar en medio de cultivo semisólido. Este es el primer resultado internacional al respecto.

Con los Sistemas de Inmersión Temporal, el comportamiento y la morfología de las plantas parecen generalmente más cercanos a la norma *in vivo* que

al comportamiento que se encuentra con el cultivo *in vitro*. Los embriones somáticos en estos sistemas están individualizados y no en forma de agregados y tienen una morfología que se parece a la de los embriones cigóticos (Etienne y Berthouly, 2002). En ninguna de las dos especies estudiadas se encontró presencia de hiperhidricidad, ni en los embriones somáticos ni en las plantas germinadas a partir de ellos.

Todas las ventajas de estos sistemas parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo como son (Etienne y Berthouly, 2002):

Contacto directo renovado con el medio de cultivo durante cada inmersión, lo que significa un aporte más eficiente de elementos nutritivos que lo alcanzado en medio de cultivo semisólido.

Tiempos de inmersión muy cortos, la mayoría del tiempo, los tejidos son cubiertos con una película superficial evitando una desecación, una muy baja

resistencia a la difusión de gases y de hecho una interrupción mínima de los intercambios de gases entre el embrión somático y la atmósfera.

- Renovación completa de la atmósfera dentro del recipiente a intervalos regulares, lo que significa que no hay acumulación larga de gases nocivos como el etileno.

- Agitación por flujo de aire durante la fase de inmersión, lo que causa la dispersión de los tejidos vegetales.

- Los resultados son siempre superiores a un medio de cultivo en estado semi-sólido.

La permanencia de una película superficial de medio líquido sobre los tejidos parece ser una de las principales razones de éxito de este sistema, pues no solamente asegura una disponibilidad nutritiva fuera de los períodos de inmersión, sino también interrumpe mucho menos los intercambios gaseosos que la inmersión total. Esta permanencia del agua residual explica también la ausencia de daños y desecación de los embriones somáticos, incluso en el caso de una inmersión muy ocasional y breve (Etienne y Berthouly, 2002).

Otra variable ligada con las condiciones físicas que parece significativa es la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo líquido cuyo efecto en los fenómenos *in vitro* es conocido desde hace muchos años (Teisson *et al.*, 1999). En el Sistema de Inmersión Temporal esta concentración alcanza la saturación solo un minuto después del burbujeo. En el caso de Erlenmeyer agitados sin tejido vegetal y sin consumo de oxígeno, la concentración de este gas disuelto nunca sobrepasa los 95% de saturación. Todos estos puntos significan que, en tal aparato, las condiciones físicas de nutrición, de intercambios de gases y de relaciones con el agua de los tejidos vegetales son completamente diferentes de las que se encuentran en las técnicas usuales. Estas condiciones fisiológicas conducen a un comportamiento totalmente diferente (Cabasson *et al.*, 1997).

REFERENCIAS

Aitken-Christie J (1991) Automation En: Debergh, PC y Zimmerman, RJ (Eds) Micropropagation: Technology and Application, pp 363-388. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Alvard, D, Cote F y Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion. Plant cell tissue and organ culture. 32: 55-60

Bieberach, C (1995) Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* sp. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae. CATIE, Turrialba, Costa Rica 84 pp

Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P y Teisson C (1997) Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50: 33-37

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

Etienne, BD, Bertrand B, Vasquez N y Etienne H (1999) Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass produced in a bioreactor and regeneration of plants. Plant Cell Rep. 19: 111-117

Etienne, H, Lartaud M, Michaux-Ferriere N, Carron MP, Berthouly M y Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using the temporary immersion technique. In vitro Cell. Dev. Biol. 33: 81-87

Etienne, H y Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215-231

Gómez, R (1998) Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, pp. 57-77. IBP, Santa Clara

Marroquín, C. (1991) Suspensiones celulares y embriogénesis somática en *Musa acuminata* spp. *malascensis*. Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica). Proceedings. pp. 183-191 INIBAP. Montpellier

Merkler, S, Parrot W y Flinn, B. (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: "In vitro" Embryogenesis in Plants. Thorpe TA (Ed), pp 155-203. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht

Murashige, T y Skoog FS (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phys Plant (5): p. 473-497

Posada, L P (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática y regeneración de plantas en dos variedades cubanas de Fruta Bomba (*Carica papaya* L.). Tesis de Diploma. Universidad Central de las Villas. 58 p. Santa Clara

Teisson C, Alvard D, Lartaud M, Etienne H, Berthouly M, Escalona M y Lorenzo JC (1999) Temporary immersion for plant tissue culture. En: Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21 st Century, Proceedings of the IXth International Congress of Plant tissue and cell culture, section H: Horf