

Influencia de la época del año sobre la capacidad embriogénica de inflorescencias masculinas inmaduras en banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*)

Laisyn Posada-Pérez, Rafael G. Kosky*, Borys Chong-Pérez, Maritza Reyes, Idalmis Bermúdez-Caraballoso. *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, CP 54 830 *e-mail: kosky@ibp.co.cu

RESUMEN

La época del año es uno de los posibles factores a tener en cuenta al momento de la toma del explante inicial para el desarrollo del proceso de embriogénesis somática. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar si la época del año en que se colectan las inflorescencias masculinas inmaduras influye sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas en el cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa AAA*). Durante tres años, mensualmente, se colectaron inflorescencias masculinas de las cuales se extrajeron los fascículos nodales más cercanos al meristemo floral y se colocaron en medio de cultivo semisólido. Se cuantificó el número de explantes contaminados y con respuesta embriogénica, por cada siembra, a los seis meses de cultivo. Con estos datos se calculó el porcentaje de contaminación microbiana y el porcentaje de fascículos que formaron callos con embriogénesis somática de alta frecuencia. Además, se estudió la posible relación de estas variables con los valores de temperatura media y precipitaciones durante los tres años. Los porcentajes de contaminación fueron muy variables en dependencia de la época del año en que fueron colectadas las inflorescencias en el campo (0 - 82.5%). Los análisis no mostraron correlación entre las variables respuesta embriogénica y porcentaje de contaminación en relación con los valores de precipitaciones y temperaturas registradas durante los tres años de la investigación. La respuesta embriogénica fluctuó de 0-11.5%. Los resultados demostraron que la época del año en que se colectaron las inflorescencias masculinas inmaduras no influyó sobre la formación de embriones somáticos en este cultivar de banano.

Palabras clave: callos, contaminación microbiana, embriogénesis somática de alta frecuencia

ABSTRACT

The season of the year is one of the possible factors to consider for taking the initial explants to develop somatic embryogenesis. This work was carried out to determine the influence of the season of the year on the callus with embryogenic structures formation, in the banana cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*) to collect immature male inflorescences are. Male inflorescences were collected for three years, every month. Nodal fascicles closest to the floral meristem were extracted and placed in semisolid medium. The number of contaminated explants and the embryogenic response for each time was quantified, six months after culture. The percentage of microbial contamination and the percentage of fascicles that formed callus with high frequency somatic embryogenesis were calculated using these data. In addition, the relationship of these variables with the values of average temperatures and precipitations during the three years were also studied. The percentages of contamination were highly variable depending on the season of the year in which the inflorescences were collected in the field (0 - 82.5%). The analysis did not show correlation between embryogenic response and percentage of contamination, in relation to rainfall and temperature values recorded during the three years of research. Embryogenic response ranged from 0-11.5%. Results showed that the season of the year to collect immature male inflorescences did not influence the formation of somatic embryos in this cultivar of banana.

Keywords: callus, microbial contamination, high frequency somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

El cultivo de bananos y plátanos se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es la enfermedad más nociva presente en las plantaciones de musáceas a nivel internacional y en Cuba. Cuatro años después

de su aparición en 1990, reemplazó a la Sigatoka amarilla (*M. musicola*) en todas las áreas del país. Esta enfermedad ha tenido un serio impacto en la producción de plátanos susceptibles. En 1989, existían más de 40 000 hectáreas de plátanos (*Musa* cv. AAB) y 14 000 hectáreas de bananos 'Cavendish' (*Musa* cv. AAA) bajo protección fúngica. A finales de 1995 se habían reducido en un 69 y 51% respectivamente. A partir de 1994, se introdujeron los cultivares FHIA 01-1, FHIA-02, FHIA-03, FHIA-18 y FHIA-21 con resistencia parcial a Sigatoka negra (Pérez *et al.*, 2002). Sin embargo, la calidad y sabor de los frutos de estos híbridos no superan a las características del cultivar 'Grande naine'.

El grupo AAA tiene tres subgrupos: Gros Michel, Cavendish y Rojo. El cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA; Cavendish) se ha propuesto como el banano comercial ideal. Este cultivar tiene entre sus principales ventajas: la altura de la planta alrededor de 2.5 m de altura, que lo hace más fácil de manejar y más estable al daño del viento, un índice de cosecha más alto que otros cultivares y el intervalo de emergencia-floración y floración-madurez fisiológica es de 196 y 122 días respectivamente, lo que hace un ciclo completo de 318 días (Soto, 1985).

En el cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA) muy pocos laboratorios en el mundo disponen de un sistema para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática. Algunos autores han logrado establecer suspensiones celulares a partir de callos con embriogénesis somática de alta frecuencia, obtenidas de flores masculinas inmaduras (Escalant *et al.*, 1994; Kosky *et al.*, 2001; Khanna *et al.*, 2004, Pérez-Hernández y Rosell, 2008). En el cultivo de las musáceas han sido establecidas varias metodologías de regeneración de plantas vía embriogénesis somática, pero no se han realizado estudios sobre el efecto de factores *ex vitro* como la época del año para la colecta de inflorescencias masculinas y femeninas utilizadas como explantes en la formación de callos con estructuras embriogénicas.

Por todo lo anterior se desarrolló este trabajo que tuvo como objetivo determinar si la época

del año en que se colectan las inflorescencias masculinas inmaduras influye sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas en el cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa* AAA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron flores masculinas inmaduras de inflorescencias (pámpanas) del cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA). Estas fueron colectadas directamente de plantas adultas que crecían en condiciones de campo en la Empresa de Cultivos Varios 'La Cuba', en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba.

Durante los tres años en que desarrolló este trabajo (2002, 2003 y 2004), se colectaron 2 975 inflorescencias durante 26 cosechas y 29 750 explantes fueron cultivados *in vitro* para lograr la formación de callos con estructuras embriogénicas.

Análisis estadístico

En todos los casos se realizaron las comprobaciones de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos. Este procesamiento de los datos se realizó con la ayuda de los paquetes estadísticos computacionales SPSS7 PC + versión 9.0 para Windows y Statgraphic versión 5.0. Los datos obtenidos fueron procesados mediante análisis de regresión.

Con el objetivo de formar callos con estructuras embriogénicas, se siguió la metodología propuesta por Escalant *et al.* (1994). Se tomaron las pámpanas cuando se habían abierto al menos de diez brácteas después de la última flor femenina, entre 25-30 cm, las cuales se trasladaron hasta las áreas exteriores del laboratorio. Con la ayuda de un cuchillo, se cortaron 10 cm antes del ápice y se eliminaron las brácteas exteriores, para reducirlas hasta una longitud aproximada de 3.0 cm (Figura 1a). De esta forma quedaron listas para ser llevadas al laboratorio para la desinfección, la cual se realizó con etanol 70% (v/v) durante 15 minutos.



Figura 1. Manejo de inflorescencias masculinas (pámpanas) del cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*) para la formación de callos con estructuras embriogénicas. a) Reducción del tamaño de la inflorescencia masculina para la posterior toma de los explantes. b) Flores masculinas inmaduras extraídas de la inflorescencia siendo colocadas en frasco de cultivo.

Transcurrido este tiempo y dentro de la cámara de flujo laminar, se enjuagaron las inflorescencias tres veces con agua destilada estéril, para eliminar los posibles residuos de etanol. El material vegetal desinfectado se mantuvo sumergido en agua estéril para evitar su deshidratación. Posteriormente, bajo un microscopio estereoscópico se extrajeron los 14 fascículos nodales (manos) más cercanos al meristemo floral (considerado este como cero) y se colocaron desde el fascículo cinco hasta el doce, en dos frascos de cultivo por cada inflorescencia masculina.

Para la formación de los callos con estructuras embriogénicas se empleó un medio de cultivo compuesto por las Sales Murashige y Skoog (1962) (MS) 100%, vitaminas MS 100%, glicina 2 mg l⁻¹, mio-inositol 100 mg l⁻¹, ácido nicotínico 0.5 mg l⁻¹, piridoxina HCl 0.5 mg l⁻¹, tiamina HCl 0.1 mg l⁻¹, biotina 1 mg l⁻¹, ácido indolacético (AIA) 1 mg l⁻¹, ácido 2,4-diclorofenolciacético (2,4-D) 4 mg l⁻¹, ácido naftalenacético (ANA) 1 mg l⁻¹, sacarosa 30 g.l⁻¹, *Phytigel* (SIGMA) 2.3 g.l⁻¹, el pH fue ajustado a 5.8 antes de la esterilización por autoclave. El medio de cultivo se dosificó en frascos de cultivo de

vidrio con volumen total de 250 ml, a los que se le adicionaron 30 ml.

Las condiciones de incubación de los fascículos nodales fueron: oscuridad y $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Se cuantificó el número de explantes contaminados y con respuesta embriogénica por cada siembra a los seis meses de cultivo. Con estos datos se calculó el porcentaje de contaminación microbiana y el porcentaje de fascículos que formaron callos con embriogénesis somática de alta frecuencia. Además, se estudió la posible relación de estas variables con los valores de temperatura media y precipitaciones durante los tres años (2002, 2003 y 2004) para determinar si la época de colecta de las inflorescencias influyó sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta fase del proceso de embriogénesis somática (inducción de los embriones somáticos), todos los explantes (fascículos nodales) formaron glóbulos meristemáticos, pero pocos de ellos llegaron a formar callos con estructuras embriogénicas, los cuales se obtuvieron a los 6 meses de cultivo (Figura 2).



Figura 2. Embriogénesis somática de alta frecuencia obtenida a partir de callos formados de inflorescencias masculinas inmaduras, después de seis meses de cultivo, en el cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*), 20x.

Los porcentajes de contaminación fueron muy variables en dependencia de la época del año en que fueron colectadas las inflorescencias en el campo (0 - 82.5%). Los valores más bajos se obtuvieron en los mismos meses, entre febrero y abril, en los tres años (Figura 3). Los análisis de regresión realizados no mostraron ningún tipo de correlación entre las variables respuesta embriogénica y porcentaje de contaminación en relación con los valores de precipitaciones y temperaturas registradas durante los tres años de la investigación.

Hasta la fecha existen pocos trabajos en la literatura científica consultada donde se señalen resultados de estudios al respecto, y en específico para el caso del proceso de embriogénesis somática y la relación de la respuesta de los explantes con las condiciones ambientales.

La respuesta embriogénica fluctuó de 0-11.5%. Se encontraron dos meses donde fueron mayores los porcentajes de respuesta embriogénica: mayo y octubre. Estos resultados no parecen tener relación con la influencia que puedan tener las lluvias y la temperatura en este parámetro estudiado.

Escalant *et al.* (1994) plantearon que la relación entre la frecuencia e intensidad de la embriogénesis somática con el factor estacional aparecen como una incertidumbre, en el cual este último puede que tenga alguna influencia con respecto a los diferentes meses del año. En los estudios realizados por estos mismos autores en el cultivar 'Grande naine' encontraron los mayores porcentajes de agregados embriogénicos, en orden descendente, en los meses de septiembre, octubre, marzo y abril para el caso de Costa Rica.

En el caso del cultivo del cafeto (*Coffea canephora* P. var. Robusta) Santana *et al.* (2004) señalaron que en cuatro clones obtuvieron una respuesta positiva de la época del año en la cual se tomaron los explantes de hojas con respecto a la respuesta embriogénica de los callos formados a partir de estos. Estos autores refirieron que en los meses de abril (99%) y junio (90%) se alcanzaron los mayores valores. Al respecto, valoraron que estos resultados favorables pudieron estar relacionados con la fase reproductiva del cultivo más que con la vegetativa.

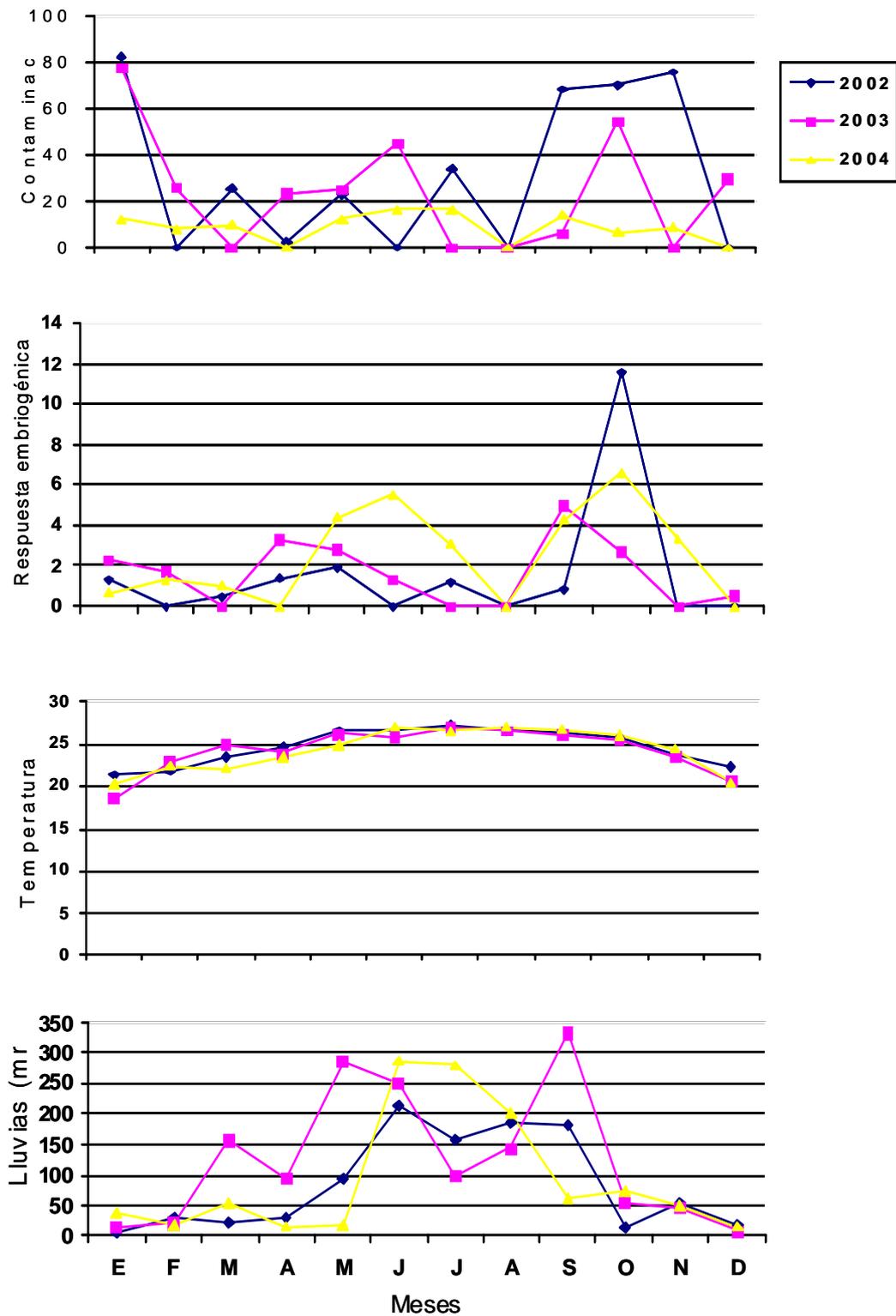


Figura 3. Relación entre los meses del año, en cuanto a los promedios mensuales de lluvias y temperaturas, con respecto a la contaminación microbiana de los explantes y su respuesta embriogénica en el cultivar 'Grande naine' en los años 2002, 2003 y 2004.

También en este mismo cultivo y variedad González *et al.* (2005) evaluaron la influencia de la época del año en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares empleados para la formación de callos. En dicho estudio encontraron que la época del año en que se tomaron los explantes ejerció un marcado efecto en su respuesta morfogénica y bioquímica en los genotipos evaluados, y comprobaron que los períodos mayo - junio, enero - febrero y noviembre- diciembre resultaron más favorable dado un elevado porcentaje de formación de callos, bajos índices de actividad enzimática peroxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica, así como un mayor contenido de proteínas totales.

Por su parte, Posada-Pérez *et al.* (2009) en el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol roja informaron que no hubo diferencias significativas en cuanto a la influencia de la época del año en la formación de embriones somáticos a partir de los embriones cigóticos inmaduros.

En los últimos años se ha publicado poco sobre esta temática y aunque los resultados de este trabajo muestran que la época del año no influyó en la formación de embriones somáticos en este cultivo, cabe señalar, que estos aspectos se deben tener presentes en la propagación masiva, ya que al considerar estos factores desde las etapas tempranas del proceso, se contribuye a garantizar una mayor eficiencia en la multiplicación.

El valor máximo de la respuesta embriogénica alcanzado fue de 11.5% para la embriogénesis somática de alta frecuencia. La baja producción de callos con estructuras embriogénicas es una de las principales limitaciones en la embriogénesis somática en los bananos y plátanos. Al respecto Escalant *et al.* (1994) señalaron que la respuesta embriogénica de flores masculinas inmaduras en el cultivar triploide 'Grande naine' (AAA) nunca excedió el 5.0% cuando se utilizó una concentración de 4.0 mg l⁻¹ de 2,4-D en el medio de cultivo, resultados inferiores a los obtenidos en este trabajo.

Por su parte, Cote *et al.* (1996) plantearon que después de cultivar flores masculinas inmaduras del cultivar 'Grande naine', durante cinco a seis meses, fueron obtenidos callos amarillos compactos y tejidos embriogénicos

friables con numerosos embriones. La respuesta en los tipos Cavendish y bananos de zonas altas es, sin embargo, muy variable y normalmente está por debajo de 1.0% cuando se utilizan otras fuentes de explantes como domos meristemáticos o *scalps* (Schoofs, 1997).

Los resultados coinciden además, con lo planteado por Navarro *et al.* (1997), quienes lograron la formación de callos amarillos compactos como paso previo, sin embargo, sólo del 2.0 al 6.0% del número inicial de explantes dieron origen a callos blancos con estructuras embriogénicas en el cultivar 'Grande naine'. Igualmente, Grapin *et al.* (1998) señalaron valores de 1.9% y 2.9% en 'Curaré Enano' (AAB) y 'Curaré' (AAB) respectivamente, con el empleo de flores femeninas como explantes. Todos estos resultados fueron corroborados por Schoofs *et al.* (1999) quienes plantearon que la respuesta embriogénica está en dependencia del genotipo usado.

Resultados más recientes fueron los informados por Jalil *et al.* (2003) con un porcentaje de callos embriogénicos de 21.75% a partir de flores masculinas inmaduras pero en *Musa acuminata* cv. 'Mas' (AA), en un medio de cultivo con mayor cantidad de suplementos.

Parrot (1993) explicó que los genotipos individuales dentro de una especie difieren ampliamente en su habilidad de experimentar la embriogénesis somática, y por lo tanto, tales diferencias genotípicas en la capacidad embriogénica probablemente reflejan diferencias en la habilidad de activar el camino embriogénico.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la época del año no influyó en la formación de embriones somáticos en este cultivar de banano.

REFERENCIAS

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

Côte F, Domergue R, Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C, Escalant JV (1996) Embryogenic cell suspensions from male flower of *Musa* AAA cv. 'Grande naine'. *Physiol Plant*. 97: 285-290

- González ME, Mazorra LM, Rodríguez Y, Cabrera M (2005) Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfológica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos. *Biotecnología Vegetal* 5(2): 119 - 121
- Grabin A, Schwendiman J, Teisson C (1996) Somatic embryogenesis in banana plant. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 32: 66-71
- Jalil M, Khalid N, Othman RY (2003) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. 'Mas' (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 209-214
- Khanna H, Becker D, Kleidon J, Dale J (2004) Centrifugation assisted *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (CAAT) of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady Finger AAB). *Molecular Breeding* 14: 239-252
- Kosky R G, del Sol L, Reyes M, Freire-Seijó M, Posada-Pérez L, Herrera I, Escalant JV (2001) Embriogénesis somática en bananos y plátanos partiendo de flores masculinas inmaduras. *Biotecnología vegetal* 1: 29-35
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Navarro, C, Escobedo RM, Mayo A (1997) *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, 'Cavendish' banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 17-25
- Parrot, WA (1993) Cell-Culture techniques. En: INIBAP (Ed) *Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement*. Proceedings of the workshop held in San José, Costa Rica. 27-31 January, 1992. San José
- Posada-Pérez L, Rodríguez A, Kosky RG, Reyes M, Tejada M (2009) Influencia de la época del año y el tipo de frasco en la embriogénesis somática en papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol roja. *Biotecnología vegetal* 9(1): 33-40
- Pérez-Hernández, JB, Rosell PG (2008) Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. 'Dwarf Cavendish') male flowers. *Plant Cell Report* 27(6): 965-971
- Pérez LV, 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 disease of bananas: present status and outlook. INIBAP pp. 71-85. Montpellier.
- Santana N, Fuente-Cerda CFJ, Barahona F, Milango-Cortes J, Loyola-Vargas VM (2004) Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagation selected Robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 40: 95-101
- Schoofs H (1997) The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thesis Ph.D. K. Leuven, Belgium. 257p.
- Schoofs H, Schoofs H, Panis B, Strosse H, Mayo A, López J, Roux N, Dolozel J, Swennen R (1999) Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *INFOMUSA* 8(2): 3-7
- Soto, M (1985) Bananos: Cultivo y comercialización. Editorial Litografía e imprenta LIL, S.A. San José, Costa Rica.