

## Respuesta en campo de plantas de 'Cavendish enano' (*Musa AAA*) obtenidas mediante embriogénesis somática

Pedro Orellana\*, Rafael G. Kosky, Leyanis García-Agula, Borys Chong-Pérez, Miladys León, Maritza Reyes, Zoe Sarría, Robin Triana, Blanca Pérez, Milagros Rodríguez. \*Autor para correspondencia

Instituto 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. e-mail: orellana@ibp.co.cu

### RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) ha sido desarrollada en varias especies de plantas con diferentes objetivos, pero en pocos casos se ha logrado la producción masiva de plantas y la evaluación de su respuesta en campo en grandes poblaciones. En algunos cultivares de *Musa* spp. se ha desarrollado la embriogénesis somática para facilitar protocolos de transformación genética, pero esta técnica puede ser una alternativa que incremente la eficiencia de la producción masiva de plantas *in vitro* a escala comercial, para la siembra en áreas de producción. Se evaluó la estabilidad de los caracteres morfológicos y cuantitativos de las plantas relacionados con los componentes del rendimiento. Se determinó además, el rendimiento agrícola bajo condiciones de producción de las plantas en comparación con plantas obtenidas de cormos (C) como sistema convencional. Los resultados mostraron que las plantas obtenidas por embriogénesis somática presentaron bajos índices de variación morfológica en el primer ciclo productivo. Además, el rendimiento agrícola fue mayor con respecto a las plantas obtenidas de cormo en ambos ciclos productivos. Estos resultados de la evaluación de poblaciones de más de 5 000 plantas obtenidas por embriogénesis somática en el cultivar 'Cavendish enano', constituyen una evidencia confiable para recomendar este método como una alternativa viable para la propagación masiva de plantas en este cultivar.

Palabras clave: propagación masiva, rendimiento, variación fenotípica

### ABSTRACT

Somatic embryogenesis (SE) has been developed in several species of plants with different objectives. Even though, the mass production of plants and the evaluation of field behaviour in big populations been achieved in few cases. Somatic embryogenesis has been developed in some cultivars of *Musa* spp. to facilitate protocols of genetic transformation. Though, this technique can be an alternative to increase the efficiency for mass production of *in vitro* plants to commercially scale for cultivation in productive areas. The aim of this paper was to determine the field behaviour dwarf of Cavendish plants obtained by somatic embryogenesis. The evaluations were carried out about the stability of the some morphological and quantitative characters of the plants related to the yield components were evaluated. The agricultural yield, under production conditions, of this plants compared to plants derived from suckers, conventionally cultured, was also determined. Results indicated that plants obtained by SE presented very few indexes of morphological variation in both productive cycles. The agricultural yield was superior with regard to the plants obtained by suckers in both cycles. Results of a population evaluated of more than 5 000 plants, obtained by SE in the cultivar 'Dwarf Cavendish', constituted a reliable evidence to recommend this method as a viable alternative for the *in vitro* mass propagation of plants in this cultivar.

Key words: mass propagation, phenotypic variation, yield

### INTRODUCCIÓN

Las técnicas de propagación *in vitro* han tenido un importante impacto en la producción de plantas para ser utilizadas como material de siembra debido a la rapidez con que se puede disponer de grandes

cantidades de semilla de alta calidad sanitaria sin comprometer la estabilidad genética, en la mayoría de las especies. La propagación vía organogénesis ha sido la más usada en la mayoría de los laboratorios comerciales en el mundo por su relativamente baja complejidad y fácil manejo. En los últimos 10

años, las investigaciones para la producción de plantas mediante embriogénesis somática se han incrementado (Vilchez *et al.*, 2002; Celestino *et al.*, 2005; Jain y Gupta, 2005; Moon *et al.*, 2008). Además, se han proyectado hacia la factibilidad de usar esta técnica para la propagación masiva (Ducos *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2008; Malo, 2009) por la reducción de la variabilidad genética (Zhao *et al.*, 2005) y los costos de producción (Dey, 2005; Masseret *et al.*, 2005).

En bananos y plátanos varias publicaciones (Cote *et al.*, 2000; Kosky *et al.*, 2001; Barranco *et al.*, 2002; Pérez y Rossell, 2008) muestran la posibilidad de usar la embriogénesis somática para producir grandes volúmenes de masas de embriones que posteriormente pueden ser convertidos en plantas sin alterar notablemente la variación genética en algunos cultivares comerciales. Sin embargo, no se ha hecho referencia a la producción comercial de plantas *in vitro* mediante embriogénesis somática en el cv. 'Cavendish enano'.

Cuba dispone de una red de biofábricas cuyo potencial productivo se estima en 50 millones de plantas *in vitro*/año mediante el uso de las técnicas convencionales de micropropagación por organogénesis apical. Lograr que la embriogénesis somática pueda ser aplicada a escala comercial permitiría incrementar el potencial productivo de estas instalaciones, reducir los costos de producción unitaria y lograr plantas de banano de calidad genética superior.

El objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta en campo de plantas de *Musa* spp. cv. 'Cavendish enano' obtenidas por embriogénesis somática.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron plantas de banano cv. 'Cavendish enano' (*Musa* AAA) obtenidas a partir de embriones somáticos, según el protocolo desarrollado por Kosky *et al.* (2002). Las plantas donantes fueron seleccionadas en plantaciones de la empresa de cultivos varios La Cuba en la provincia de Ciego de Ávila. Las plantas obtenidas por embriogénesis somática previo a su siembra en campo se mantuvieron en casa de cultivo por 60 días. Después de este periodo

contaban con aproximadamente 20 cm de altura y de tres a cuatro hojas expandidas.

Las plantas fueron sembradas en campo, sobre un suelo ferralítico rojo, en la misma empresa, a una densidad de 2 222 plantas ha<sup>-1</sup> (distancia de 3.0 m entre hileras de doble surco separados a 1.5 m y a 2.0 m entre plantas).

Durante el desarrollo de la plantación se empleó riego por aspersión mediante microjet aéreo. Además, se realizó fertilización química según lo recomendado en el Instructivo técnico para el cultivo de plátanos y bananos (MINAG, 1994) y se aplicó la protección química para el control de Sigatoka negra mediante la predicción por pronóstico según Pérez-Vicente (1998). El deshije se realizó de forma manual con la estructura de un hijo principal y un seguidor plantón. Como control experimental, se emplearon plantas originadas de semilla asexual (cormo) cultivadas en la misma empresa. En total fueron sembradas 6 720 plantas obtenidas por embriogénesis somática y 510 procedentes de cormo.

Las evaluaciones realizadas en ambas poblaciones de plantas, durante dos ciclos reproductivos, se basaron en la observación y cuantificación de plantas con variaciones en caracteres de la morfología de la planta, la inflorescencia y el racimo, según lo establecido en el descriptor de variedades de INIBAP (IPGRI-INIBAP/CIRAD, 1996). Estas evaluaciones se realizaron en la floración y en la cosecha. Además, en la cosecha se determinó el rendimiento agrícola y sus componentes en 50 plantas seleccionadas al azar por cada método de propagación que no mostraran variaciones morfológicas con respecto al fenotipo del cultivar. Durante el segundo ciclo, el rendimiento se determinó en el primer hijo de la misma planta seleccionada en el primer ciclo.

### *Procesamiento estadístico*

Para el procesamiento estadístico de los datos se aplicaron modelos de análisis de varianza (ANOVA) previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov a las variables evaluadas. Para los

análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.0 para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que la variación total en los caracteres morfológicos en plantas propagadas por embriogénesis somática en el cv. 'Cavendish enano' alcanzó un valor total de 0.34% (Tabla 1). Esta variación fue baja si se compara con los resultados de otros autores como Shchukin *et al.* (1988), quienes refieren valores entre 1.6-7.9% de variantes somaclonales en plantas provenientes de ES de 'Grande naine'. Por su parte, Kosky *et al.* (2006) informaron una variación total de 0.7% y de 0.3% en plantas obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis, respectivamente, en el cv. híbrido de banano 'FHIA 18' (*Musa AAAB*).

Las variantes morfológicas de mayor frecuencia encontradas fueron las plantas de porte bajo y la disminución en la circunferencia del pseudotallo. En una misma planta se encontró más de una variante, siendo las de mayor coincidencia las de porte bajo con menor circunferencia del pseudotallo y deformaciones en el raquis y racimo (Tabla 1). Ello difiere de lo descrito por Barranco *et al.* (2002) quienes indicaron que en 'FHIA 18', la ocurrencia de dos tipos de variaciones en la misma planta fue poco común. Estos autores también informaron que el enanismo es la variante más común del subgrupo Cavendish y representa el 75-90% de las variantes totales. Así mismo, otros autores (Hwang, 1986; Reuveni *et al.*, 1986; Stover y Buddenhagen, 1986; Stover, 1987; Côte *et al.*, 1993; Israeli *et al.*, 1995) han coincidido en señalar que el enanismo es una de las variantes somaclonales más comunes en bananos, se trasmite después de varios subcultivos *in vitro* y también por propagación convencional, es decir este cambio es estable genéticamente.

En las población control, sólo una planta mostró porte bajo y deformación en la primera mano del racimo, lo cual indicó un 0.19% de variación total. Referido a la variación en la primera mano, es común en este cv. encontrar esta característica en muchos racimos.

Tabla 1. Tipo y frecuencia de cambios en caracteres morfológicos y cuantitativos en plantas variantes encontradas en las

poblaciones obtenidas por embriogénesis somática y de cormos del cultivar 'Cavendish enano' a los 12 meses en el primer ciclo de cultivo. ECV 'La Cuba', Ciego de Ávila.

En el segundo ciclo de cultivo las únicas variaciones que permanecieron fueron las referidas al porte bajo de la planta y menor circunferencia del pseudotallo en las mismas plantas detectadas en el primer ciclo. Las variantes de cambios de coloración en el peciolo y las brácteas, así como las deformaciones en el racimo y raquis, no presentes en el segundo ciclo, indicaron que probablemente se debieron a cambios epigenéticos ocurridos por los efectos del cultivo *in vitro per se*. Estos resultados coinciden con lo observado por Barranco *et al.* (2002) en estudio de poblaciones de plantas de 'FHIA18' obtenidas por embriogénesis somática.

Las evaluaciones en las variables cuantitativas relacionadas con el rendimiento, durante el primer ciclo al comparar los dos métodos de propagación, mostraron que en las plantas obtenidas por embriogénesis somática se redujo el tiempo del ciclo siembra-cosecha con respecto a las originadas de cormo. Además, no difirieron significativamente en la altura de la planta pero sí en el resto de las variables donde mostraron valores superiores, incluyendo un mayor peso del racimo (Tabla 2). Estos resultados mostraron que por embriogénesis somática se favorece un mejor desarrollo de las plantas con respecto a las originadas de cormo.

En el segundo ciclo se encontraron diferencias significativas en la altura de la planta y se mantuvo la superioridad de las plantas obtenidas por embriogénesis somática, respecto a las de cormo en todas las variables evaluadas, con excepción del número de dedos de la primera mano que no difirió entre las dos poblaciones (Tabla 2). La mayor altura de la planta y el diámetro del pseudotallo pudo estar relacionado con efecto del rejuvenecimiento y saneamiento provocado por el cultivo *in vitro*, lo cual es muy frecuente en plátanos y bananos (Zamora *et al.*, 1989; Drew y Smith, 1990; Sandoval *et al.*, 1991; Israeli *et al.*, 1991). En la mayoría de los cv. de banano el rendimiento agrícola y los valores de las variables cuantitativas relacionadas con este, son mayores y logran su estabilidad a partir del segundo ciclo de cultivo.

Tabla 1. Tipo y frecuencia de cambios en caracteres morfológicos y cuantitativos en plantas variantes encontradas en las poblaciones obtenidas por embriogénesis somática y de cormos del cultivar 'Cavendish enano' a los 12 meses en el primer ciclo de cultivo. ECV «La Cuba», Ciego de Ávila.

Origen de la población	Número total de plantas con variaciones/%	Posición de las hojas			Altura de la planta (cm)			Circunferencia del pseudotallo (cm)			Posición del racimo		Posición del raquis		Número de manos/racimo				Variación en 1ra mano y dedos			
		Erectas	Decumbente	Normales	? 120	121-150	151-170	? 40	41-50	51-60(Normal)	Normal	Variante	Normal	Variante	8	9	10	11	Normal	Variante	Sin racimo	Cambio de color en peciolo y brácteas
<b>ES</b>	20	11	1	8	2	13	5	6	8	6	10	7	10	7	5	5	3	4	9	8	3	2
	0.34	0.20				0.34						0.12		0.12			0			0.15		0.034
<b>C</b>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	0.19					0.19														0.19		

ES: Embriogénesis somática, C: Cormos

Tabla 2. Caracteres cuantitativos de plantas de banano cv. 'Cavendish enano' obtenidas por embriogénesis somática (ES) y cormos (C), durante el primero y segundo ciclo de cultivo. Finca No. 17, ECV 'La Cuba', Ciego de Ávila.

Origen de las plantas	Ciclo	Tiempo de cultivo (meses)	Altura de la planta (cm)	Circunferencia del pseudotallo (cm)	No. de manos por racimo	No. de dedos de la 1 <sup>ra</sup> mano	Peso del racimo (kg)
C	1 <sup>er</sup> ciclo	13	170.2 ± 3.5	51.0 ± 1.9 c	6.6 ± 0.6 d	19.5 ± 1.6 c	12.3 ± 1.1 d
	2 <sup>do</sup> ciclo	19	180.6 ± 7.0	53.4 ± 2.2 b	7.6 ± 0.8 c	21.4 ± 2.0 b	14.4 ± 1.5 c
ES	1 <sup>er</sup> ciclo	12	171.3 ± 9.0	53.4 ± 1.9 b	9.0 ± 0.9 b	24.4 ± 5.3 a	18.5 ± 1.2 b
	2 <sup>do</sup> ciclo	18	194.3 ± 9.3	58.3 ± 3.4 a	10.7 ± 0.8 a	22.4 ± 4.7 b	21.4 ± 2.2 a
	3 <sup>er</sup> ciclo			a			

Medidas con letras diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas para valores de  $P \leq 0.05$  según ANOVA.  $n=50$

## CONCLUSIONES

Estos resultados, basados en el estudio de poblaciones de plantas relativamente grandes en el cultivar 'Cavendish enano', durante dos ciclos reproductivos, mostraron una mejor respuesta de las plantas obtenidas por embriogénesis somática con respecto a las de cormo, en lo referido a una baja frecuencia de variaciones fenotípicas y mayor rendimiento agrícola en plantaciones comerciales. La baja frecuencia de variaciones fenotípicas (0.34%), y el rendimiento agrícola superior evidencian la factibilidad de utilizar este método para la propagación masiva de plantas en el cultivar de banano 'Cavendish enano'.

## REFERENCIAS

Barranco, LA, Kosky RG, Reyes VM, Chong-Pérez B (2002) Embriogénesis somática en *Musa* (AAAB), cv. 'FHIA-18' empleando medios de cultivo líquidos. *Biotecnología Vegetal*. 2 (2): 95-100

Celestino, C, Hernández I, Carneros E, López D, Toribio M (2005) La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest. Agrar: Sist. Recur. For.* 14(3): 345-357

Côte, F, Sandoval J, Marie PH, Auboiron E (1993) Variations in micropropagated bananas and plantains: literature survey. *Fruits* 48(1):11-20

Cote, F, Folliot M, Domergue R, Dubois C (2000) Field performance of embryogenic cell suspension-

derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grand Naine). *Euphytica* 112: 245-251

Dey, S (2005) Cost-effective mass cloning of plants in liquid media using a novel growtek bioreactor. En: Hvoslef y Preil (Eds). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer. Dordrecht

Drew, RA, Smith MK (1990) Field evaluation of tissue-cultured bananas in south-eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30:569-574

Ducos, JP, Gabbe G, Lambot C, Pétiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 43:652-659

Kosky RG, del Sol L, Reyes M, Freire-Seijo M, Posada-Pérez L, Escalant JV (2001) Embriogénesis somática en bananos y plátanos partiendo de flores masculinas inmaduras. *Biotecnología vegetal* 1(1): 29-35

Kosky RG, de Feria M, Posada-Pérez L, Gilliard T, Bernal MF, Reyes M, Chávez M, Quiala E (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18(AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 21-26

Kosky RG, Barranco LA, Chong-Pérez B, Daniels D, Reyes 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

- Hwang, S (1986) Variation in banana plants propagated through tissue culture. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science* 32(2):117-125
- IPGRI-INIBAP/CIRAD (1996) Descriptores para el banano (*Musa* spp.). Instituto Internacional de recursos fitogenéticos, Roma, Italia; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y del Plátano, Montpellier, Francia; y el Centre de coopération International en reserche agronomique pour le développement, Montpellier, Francia
- Israeli, Y, O Reuveni, E Lahav (1991) Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Scientia Horticulturae* 48: 71-88
- Israeli, Y, Lahav E, Reuveni O (1995) *In vitro* culture of bananas. En: Gowen S R (Ed) Bananas and Plantains, pp.147-178. Chapman and Hall. London
- Jain, SM, Gupta PK (2005) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. En: Jain S Mohan, Gupta Pramod K (Eds) Forestry Sciences. Vol. 77. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht
- Malo, GE (2009) Micropropagación comercial de café por Embriogénesis somática. Proyecto ECOM-CIRAD. Centro de Producción para el desarrollo de la Agroferestería Tropical. América Central 2009. Unidad de Producción Sébaco. Sébaco
- Masseret, B, Alvarez M, Fontanel A, Pétiard V (2005) Conformity of cocoa trees produced via somatic embryogenesis. Malaysian International Cocoa Conference, 18-19 July 2005. Kuala Lumpur
- MINAG (1994) Instructivo Técnico del Plátano, La Habana, Cuba
- Moon, HK, Park SY, Kim YW, Kim SY (2008) Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 44:119-127
- Pérez, HJB, Rosell GP (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-Vicente, L (1998) Control de la Sigatoka negra en Cuba: Un enfoque de manejo integrado de la enfermedad. *INFOMUSA* 7(1):26-30
- Reuveni, O, Israeli Y, Eshadat Y, Degany H (1986) Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. IBPGR Final Report. 36p.
- Sandoval, J, Tapia A, Muller L, Villalobos A (1991) Observaciones sobre la variabilidad encontrada en plantas micropropagadas de *Musa* cv. Falso Cuerno (AAB). *Fruits* 46 (5): 533- 539
- Shchukin, A, Ben-Bassat, De Israeli Y (1998) Somaclonal variation and horticultural performance of Grande naine bananas multiplied via somatic embryogenesis or shoot-tip culture En: Proceeding of the IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. June 14-19. Jerusalem, Israel
- Stover, R, Buddenhagen I (1986) Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41(3): 175-191
- Stover R (1987) Somaclonal variation in Grand Naine and Saba bananas in the nursery and field. En: Persley GJ & De Langhe E (Eds) Bananas and plantain breeding strategies. p. 187. Aciar Proceedings. Australia
- Vargas, TE, Xena N, Vidal MC, Oropeza M, De García E (2008) Estabilidad genética de plántulas de *Solanum tuberosum* L. cv. 'Desirée' a partir de cultivo de células embriogénicas en suspensión. *Interciencia* 33(3): 213-218
- Vilchez, JA, Albany NR, Kosky RG, García-Águila L (2002) Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 19:284-293
- Zamora, AB, Damasco OP, Estaño ES, Barba RC, Pateña LF (1989) Note: Growth and yield of micropropagated and sucker-derived banana plants (*Musa* spp. cv. Lakatan, Bungulan and Saba). *The Philippine Agriculturist* 72(4):458-465
- Zhao, Y, Brian WWG, Crisp P (2005) Variations in morphology and disease susceptibility of micropropagated rhubarb (*Rheum rhaponticum*) PC49, compares to conventional plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 357- 361