

## Evaluación en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares en cv. 'Navolean' (*Musa* spp., AAB)

J. López<sup>1\*</sup>, R. Gómez<sup>2</sup>, H. Toledo<sup>1</sup>, N. Montano<sup>1</sup>, A. Rayas<sup>1</sup>, D. Reinaldo<sup>1</sup>, B. Chong<sup>2</sup>, M. Cabrera<sup>1</sup>, A. Santos<sup>1</sup>, J. Ventura<sup>1</sup>, V. Medero<sup>1</sup>, M. García<sup>1</sup>, M. Basail<sup>1</sup>, A. Cantero<sup>1</sup> y J. Arbel<sup>1</sup> \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6, Sto. Domingo., Villa Clara, CP 53 000, Cuba. e-mail: jlopez@inivit.co.cu

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), UCLV, Carretera Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, CP 54 830, Cuba.

### RESUMEN

El uso de ápices de brotes de yemas axilares para la inducción de callos con estructuras embriogénicas en el cultivar de plátano vianda 'Navolean' (Grupo AAB), permitió el desarrollo de una metodología de regeneración de plantas por embriogénesis somática en el cultivar objeto de estudio. Con el objetivo de conocer la variabilidad fenotípica que se podría producir mediante la misma, se plantaron en el campo 1 000 plantas que se compararon durante dos ciclos de cultivo con otras procedentes de embriones somáticos obtenidos de *scalps* de multiyemas como explante inicial, con plantas obtenidas por organogénesis (ápices meristemáticos) y mediante la propagación convencional (cormos). Para ello se evaluaron los principales caracteres morfológicos de la planta y componentes del rendimiento. La frecuencia total de variación somaclonal durante el primer ciclo de cultivo en las plantas procedentes de embriones somáticos donde el explante inicial habían sido ápices de brotes de yemas axilares fue de 1.1% y de 8.6% en las plantas regeneradas de embriones somáticos *scalps* de multiyemas. Luego en este mismo ciclo de cultivo las plantas regeneradas de embriones somáticos (ambas procedencias) mostraron un comportamiento similar entre ellas y en todas las variables evaluadas fueron superiores en relación con las plantas procedentes de cormos con diferencias significativas. En el segundo ciclo de cultivo, al evaluar los hijos, de las plantas estudiadas no se observaron diferencias significativas en los componentes del rendimiento, independientemente del método de propagación utilizado. Referente a la variación somaclonal, se obtuvo el menor índice en las plantas obtenidas por embriogénesis a partir de ápices de yemas axilares. Finalmente se demostró la factibilidad de utilizar la nueva metodología desarrollada.

Palabras clave: suspensiones celulares embriogénicas, variación somaclonal

### ABSTRACT

The use of shoots apexes from axillary buds for callus induction with embryogenic structures in plantain 'Navolean' (Group AAB) permitted to develop a plant regeneration method through out somatic embryogenesis. In order to know the phenotypic variants that may be produced with the previously mentioned method, 1000 plants were planted in field conditions in comparison to those coming from somatic embryos obtained from multibuds as initial explants and organogenesis-derived plants (shoot tips) and conventionally derived plants (corms), during two growing cycles. The main morphological characters and yield components were evaluated. The total frequency of somaclonal variation during the first growing cycle in plants coming from somatic embryos obtained from shoots apexes from axillary buds as initial explants were 1.1%, and 8.6% in regenerated plants from somatic embryos obtained from multi-buds as initial explants. Later, in this same growing cycle, plants regenerated from somatic embryos (both sources) showed a similar performance between them and they were significantly superior in all evaluated variants in comparison to corm-derived plants. In the second growing cycle, significant differences were not observed in yield components of suckers from evaluated plants, in spite of the propagation method used. With regard to somaclonal variation, the best performance was obtained with shoots apexes from axillary buds as explants. Finally, the feasibility of using the new method was shown.

Key words: embryogenic cell suspensions, somaclonal variation

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de los plátanos y bananos (*Musa* spp.) constituye una fuente importante de alimento para una gran parte de la población mundial, de los cuales se cultivan 10 millones de hectáreas y de ellas el 21% corresponde a los plátanos AAB (Frison *et al.*, 2004).

En Cuba, su producción contribuye a lograr la estabilidad de productos alimentarios en el mercado, debido a su capacidad de producir durante todos los meses del año, así como por su diversidad de usos (Rodríguez, 2000).

El empleo de la embriogénesis somática permite obtener producciones superiores en un menor período

de tiempo y a un costo más bajo, lo cual hace que este método sea potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Ibaraki y Kurata, 2001). Además, constituye una herramienta auxiliar para la mejora genética de este cultivo (Perea, 2001; Escalant y Jain, 2004). Sin embargo, su uso en los plátanos AAB tipo *Horn* y *Pseudo horn* resulta un proceso muy laborioso, debido a la necesidad de realizar múltiples subcultivos con altas concentraciones de 6-bencil aminopurina ( $22.5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) para la obtención de las multiyemas de las que se toman los *scalps* como explantes iniciales para la formación de callos, lo cual consume mucho tiempo (Schoofs *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó el presente trabajo con el objetivo de evaluar el comportamiento en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática en el cv. 'Navolean' a partir de una nueva fuente de explante inicial: ápices de brotes de yemas axilares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Plantas enraizadas del cv. 'Navolean' (*Musa* AAB), obtenidas por embriogénesis somática según la metodología propuesta por López *et al.* (2004) a partir del explante inicial: ápices de brotes de yemas axilares *in vitro* y a partir de la metodología elaborada por Dhed'a *et al.* (1991), mejorada por Schoofs (1997) donde el explante inicial para el desarrollo de la embriogénesis son *scalps* de multiyemas.

Además se emplearon plantas obtenidas por la propagación de ápices meristemáticos según López (1999).

### Evaluación en fase de aclimatización

Se evaluó la supervivencia y desarrollo en condiciones ambientales *ex vitro* de las plantas obtenidas por embriogénesis somática con ápices de brotes de yemas axilares como explante inicial. Las mismas se compararon con las plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de *scalps* de multiyemas y las propagadas de ápices meristemáticos (organogénesis). De cada procedencia se evaluaron 1 000 plantas.

A los cinco días de transferidas a la fase de aclimatización se evaluó el porcentaje de supervivencia. Luego a los 60 días se evaluaron las principales variables fenotípicas (en 60 plantas por cada tratamiento estudiado), según metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997), las cuales fueron las siguientes: altura de la planta, largo del pecíolo de la hoja dos, largo de la hoja dos, ancho de la hoja dos, distancia entre las hojas dos y tres (todas expresadas en cm). Además, se

evaluaron en toda la población las variaciones fenotípicas, cambio de coloración en las hojas y el pseudotallo y las hojas deformadas.

### Evaluación en campo

Para evaluar la variabilidad fenotípica que se podría producir, mediante la propagación por embriogénesis somática a partir de ápices de brotes yemas axilares y *scalps* de multiyemas, se plantaron en el campo 1 000 plantas por cada variante estudiada, en comparación con plantas procedentes de organogénesis (ápices meristemáticos) y propagación convencional (cormos), durante dos ciclos de cultivo.

La plantación se realizó en el INIVIT en un suelo Pardo Sialítico Cálcico Carbonatado (Hernández *et al.*, 1999). La distancia de plantación utilizada fue de 3.00 x 2.50 m con tres plantas/nido según Rodríguez *et al.* (2000). Para el segundo ciclo se utilizaron los hijos del primer ciclo.

Se evaluó en ambos ciclos en campo, a los seis meses de la plantación y en el momento de la cosecha (en toda la población) la frecuencia de variantes totales (%), con respecto a las plantas normales y los principales componentes del rendimiento en el momento de la cosecha (a partir de 60 plantas de cada tratamiento estudiado).

La frecuencia de variantes fenotípicas (%) con respecto a las plantas normales, se evaluó a los seis meses de la plantación para ambos ciclos en campo y en el momento de ambas cosechas, cuando se evaluaron los principales componentes del rendimiento, según la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997), tales como: variaciones fenotípicas observadas a los seis meses y momento de la cosecha (cambio de coloración en las hojas y el pseudotallo, hojas deformadas y variaciones en el racimo en el momento de la cosecha), variables vegetativas en el momento de la cosecha (altura de la planta, medida desde la base hasta la inserción en forma de V de las últimas hojas emitidas (m), diámetro del pseudotallo, medido a un metro de la base de la planta (cm), número de hojas activas, área foliar de la penúltima hoja emitida ( $\text{m}^2$ ) y variables de producción en el momento de la cosecha (peso del racimo (kg), número de manos del racimo, número de dedos por racimos, largo del dedo central de la segunda mano (LDC2) (cm), largo del dedo central de la penúltima mano (LDCP) (cm) y largo del dedo central de la última mano (LDCU) (cm).

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza multivariado y para la comparación múltiple de medias se aplicó según Student-Newman-Keuls y Dunnett's C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación en fase de aclimatización

El porcentaje de supervivencia de las plántulas en la fase de aclimatización fue superior al 97% en los tres tipos de materiales vegetales en estudio (plantas obtenidas por embriogénesis somática con ápices de brotes de yemas axilares como explante inicial 98.5%, plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de *scalps* de multiyemas 98% y propagadas de ápices meristemáticos (organogénesis) 97.5%).

Se observó variación somaclonal correspondiente a hojas variegadas, en un 0.4% en las plantas obtenidas por embriones somáticos del explante inicial ápices de brotes de yemas axilares y organogénesis. En el caso de las plantas derivadas de embriones somáticos a partir *scalps* de multiyemas fue de 0.5%.

Côte *et al.* (2000), durante la fase de aclimatización de plantas regeneradas de embriones somáticos en el cv. 'Gran Enano' (AAA) observaron entre el 0.5-1.3% de hojas variegadas.

### Evaluación en campo

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas en campo, las evaluaciones fenotípicas realizadas a los seis meses permitieron determinar otros cambios morfológicos entre las plantas regeneradas por embriogénesis somáticas (a partir de ápices de brotes de yemas axilares y *scalps* de multiyemas) y los controles utilizados (micropropagación por ápices meristemáticos y cormos).

La frecuencia total de variación somaclonal durante el primer ciclo de cultivo en las plantas procedentes de embriones somáticos del explante inicial ápices de brotes de yemas axilares fue de 1.1% y de 8.6% en las plantas regeneradas de embriones somáticos del explante inicial *scalps* de multiyemas (Tabla 1).

Según Scowcroft (1984) el uso de yemas adventicias produce mayor inestabilidad genética que cuando se utilizan yemas axilares en la multiplicación. Al respecto Dhed'a *et al.* (1991) al emplear las multiyemas para el desarrollo de suspensiones celulares en el cv. 'Bluggoe' (ABB) observó un 5-10% de embriones somáticos anormales. También Schoofs *et al.* (1997) con el uso del explante anterior observaron a nivel de fase de aclimatización un 1.8% de plantas fuera de tipo del cv. 'William' (AAA, Cavendish).

Schoofs *et al.* (1999) señalaron como un caso extremo de tipos anormales, el número excesivamente alto (597/600) de la variante somaclonal denominada hojas larga y angostada en las plantas obtenidas del cv. 'Willians' (AAA

'Cavendish'), a partir de suspensiones celulares embriogénicas derivada de *scalps* de multiyemas.

Sandoval *et al.* (1991) obtuvieron en plantas micropropagadas del cv. 'Falso Harton' (AAB) un porcentaje de variación somaclonal que osciló entre 0.2-5.2% y en otros casos un porcentaje total de variación de 14.2%.

Por su parte, Barranco (2001), obtuvo un total 0.2% de variación fenotípica en el cv. 'FHIA 18', en plantas provenientes de embriones somáticos evaluadas en campo.

Del total de variantes somaclonales observadas durante el primer ciclo de evaluación en campo sólo se observó en el segundo ciclo de cultivo la regresión al plátano tipo *French* en las plantas obtenidas de los explantes iniciales de *scalps* de multiyemas que representó el 8.6% de las plantas regeneradas. Al respecto, Vuylsteke (2001) señaló que este tipo de variante somaclonal de inflorescencia se mantiene estable en los plátanos, lo cual sugiere que esta variación es de origen genético.

Según Stover (1987) las plantas de banano con menos del 5% de plantas fuera de tipo son consideradas comercialmente aceptables, mientras que otros autores como Hwang y Tang (1996) citado por Sahijram *et al.* (2003) consideran como rango aceptable de variantes somaclonales de 3-5%.

En el primer ciclo vegetativo (Tabla 2) las plantas procedentes de embriones somáticos y las plantas obtenidas de los ápices meristemáticos, (organogénesis) tuvieron un comportamiento similar, referente a la altura de la planta y números de hojas activas. Difieron significativamente ambos grupos de plantas (embriogénesis y organogénesis) provenientes del cultivo *in vitro*, de las plantas obtenidas a partir de cormos.

En relación con el diámetro del pseudotallo las plantas obtenidas de embriones somáticos alcanzaron el mayor valor (49.68 cm), las cuales se diferenciaron estadísticamente con las plantas provenientes de organogénesis (48.44 cm) y estas a su vez con las de cormo que alcanzaron el menor valor (47.69 cm). En relación con el área foliar no hubo diferencias significativas entre las diferentes plantas evaluadas.

Este incremento de las variables evaluadas a favor del cultivo de tejidos puede estar relacionado con el rejuvenecimiento fisiológico *in vitro* que se produce al perder el tejido la señal que poseía de la planta madre, siendo esta pérdida más rápida a medida que el explante sea más pequeño, esto se manifiesta con un aumento en el vigor fisiológico de determinadas variables agronómicas (Pérez, 1998).

Tabla 1. Variantes fenotípicas observadas en las plantas obtenidas del cv. 'Navolean' por embriogénesis somática y organogénesis durante el primer ciclo vegetativo en campo a los seis meses y al momento de la cosecha.

Tipo de variante	YA		MY		Organog.		Campo	
	No. plantas	%	No. plantas	%	No. plantas	%	No. plantas	%
Hojas variegadas	4	0.4	5	0.5	4	0.4	0	0
Hojas deformadas	0	0	3	0.3	0	0	0	0
Cambio color pseudotallo	7	0.7	8	0.8	1	0.1	1	0.1
Regresión a <i>French</i> (en cosecha)	0	0	70	7.0	0	0	0	0
Cambios totales	11	1.1	86	8.6	5	0.5	1	0.1

YA-plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares como explante inicial, MY plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de *scalps* de multiyemas como explante inicial.

Tabla 2. Comportamiento en condiciones de campo de plantas del cv. 'Navolean' obtenidas por embriogénesis somática, organogénesis y cormos durante el primer ciclo vegetativo a los 420 días.

Tratamiento	Características vegetativas			
	Altura de la planta (cm)	Diámetro del pseudotallo (cm)	No. de hojas activas	Área foliar (m <sup>2</sup> )
ES YA	258.08 a	49.68 a	5.75 a	1.04
MY	258.08 a	49.68 a	5.75 a	1.04
Organogénesis	257.43 a	48.44 b	5.48 a	1.02
Cormos	252.36 b	47.69 c	4.71 b	1.04
ES ±	0.19*	0.06*	0.06*	0.07n.s.
	D.C	D.C	D.C	SNK

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba especificada. SNK Student-Newman-Keuls, D.C Dunnett's C. ES, Embriogénesis somática, YA-plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares como explante inicial, MY plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de *scalps* de multiyemas como explante inicial.

Al evaluar las características del racimo como componente principal del rendimiento se observó la misma tendencia que cuando se evaluaron los caracteres vegetativos anteriormente estudiados.

Se demostró que las plantas regeneradas de embriones somáticos (ambas procedencias) mostraron un comportamiento similar entre ellas y en todas las variables evaluadas fue superior en relación con las plantas procedentes de cormos con diferencias significativas (Tabla 3). El peso del racimo de las plantas provenientes de los embriones somáticos en ambos casos fue de 10.10 kg por planta diferente significativamente con los pesos obtenidos de los racimos en las plantas procedentes del campo (8.48 kg).

Luego, en el segundo ciclo vegetativo del cultivo, al evaluar la descendencia (hijos), de las plantas evaluadas con anterioridad, se observó que tanto en las características vegetativas de crecimiento evaluadas (altura de la planta, diámetro del

pseudotallo, número de hojas y área foliar) como en los principales componentes del rendimiento, independientemente del método de propagación utilizado, no mostraron diferencias significativas (datos no mostrados), lo cual responde a la atenuación del efecto en el rejuvenecimiento fisiológico de los hijos de las plantas madres que se evaluaron con anterioridad en su primer ciclo vegetativo unido a la influencia del ambiente.

Los resultados alcanzados en esta investigación demostraron que las plantas evaluadas durante dos ciclos de cultivo en campo, regeneradas de embriones somáticos (a partir del explante inicial ápices de brotes de yemas axilares), mantuvieron al final de su segundo ciclo sus características fenotípicas y de rendimiento agrícola. En el caso de la otra metodología utilizada como control, produjo un total de 8.6% de plantas con la regresión de tipo *French-Horn* a *French* en el cultivar objeto de estudio lo cual muestra la superioridad de la metodología desarrollada.

Tabla 3. Características del racimo de las plantas del cv. 'Navolean' obtenidas por embriogénesis somática, organogénesis y cormos durante el primer ciclo vegetativo en campo a los 420 días.

Tratamiento		Características del racimo					
		Peso racimo (kg)	Número de manos	Número de dedos	LDC2 (cm)	LDCP (cm)	LDCU (cm)
ES	YA	10.10 a	7.03 a	38.43 a	24.0 a	20.96 a	18.01 a
	MY	10.10 a	7.03 a	38.43 a	24.02 a	20.96 a	18.01 a
Organogénesis		10.01 a	6.85 a	37.33 a	23.00 b	20.79 a	17.57 b
Campo		8.48 b	4.9 b	34.03 b	20.95 c	19.04 b	16.52 c
ES ±		0.04*	0.06*	0.17*	0.05*	0.06*	0.05*
		D.C	D.C	D.C	SNK	D.C	D.C

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para  $p < 0,05$  según la prueba especificada. SNK Student-Newman-Keuls, D.C Dunnett's C.

ES, Embriogénesis somática; LDC2, Largo del dedo central de la segunda mano (cm); LDCP, Largo del dedo central de la penúltima mano (cm); LDCU, Largo del dedo central de la última mano (cm).

YA-plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares como explante inicial, MY plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de *scalps* de multiyemas como explante inicial.

## CONCLUSIONES

Se demostró durante dos ciclos de cultivo en campo la superioridad de la metodología desarrollada que propone el uso de ápices de brotes de yemas axilares como material vegetal inicial para obtener plantas del cv. Navolean mediante embriogénesis somática. Las variaciones somaclonales observadas durante la fase de aclimatización y primer ciclo de cultivo en campo, no fueron estables en su segundo ciclo de cultivo.

## REFERENCIAS

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

Côte, 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

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, Côte F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 181-186

Escalant, JV, Jain SM (2004) Banana improvement with cellular and molecular biology, and induced mutations: Future and perspectives. En: Jain SM y Swennen R (eds). *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*. pp. 359-367. Science Publishers, Inc., Enfield

Frison, EA, Escalant JV, Sharrock S (2004) The global *Musa* genomic consortium: A boost for banana improvement. En: Jain SM y Swennen R (eds). *Banana Improvement: Cellular,*

Molecular Biology and Induced Mutations, pp. 341-349. Science Publishers, Inc., Enfield

Hernández, A, Pérez JM, Bosh D, Rivero L, Camacho E (1999) Nueva versión de clasificación de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGRINFOR, Ministerio de la Agricultura, Ciudad de La Habana, Cuba. 64 p.

Ibaraki, Y, Kurata K (2001) Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 179-199

López, J (1999) Genetic improvement of *Musa* spp. by *in vitro* mutational plant breeding. *Infomusa* 8: 2 - PROMUSA XV

López, J, Gómez R, Montano N, Rayas A, Cabrera M, Santos A, Reinaldo D, Trujillo R, Ventura J, Toledo H (2004) A new method for establishing embryogenic cell suspensions in plantain (AAB). XVI Reunión Internacional ACORBAT; Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México. 185p.

Pérez, JN (1998) Variación somaclonal. En: Pérez JN (ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp 105-121. IBP, Santa Clara

Pérez, JN, Agramonte D, Jiménez F, Ramírez D (1999) Informe Final del Proyecto Desarrollo y perfeccionamiento de la propagación masiva en las fases III y IV, enraizamiento y adaptación en caña de azúcar, papa, plátanos y bananos y adaptación de semillas artificiales en caña de azúcar IBP, Santa Clara

Perea, M (2001) La biotecnología como soporte en el mejoramiento de las Musáceas. En: Perea M (ed). *Biotecnología Agrícola. Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*, pp 139-149. Bogotá

Rodríguez, S (2000) Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca plátanos y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos de la producción (FAP) y su manejo integrado. Informe final Proyecto 00200091, INIVIT, Programa Nacional Científico. 96p.

Sahijram, L, Soneji JR, Bollamma KT (2003) Somaclonal variation in micropropagated banana an analysis. En: Chandra R y Mishra M. (eds). *Comprehensive micropropagation of Horticultural Crops*, pp 221-236. IBDC. Kakori, Lucknow