

Efecto de la densidad de inoculación en la maduración de embriones somáticos de plátano cv. 'FHIA-21' (*Musa AAAB*)

Harol González Gallardo, Leyanis García-Águila*, Rafael G. Kosky, Alexis Rodríguez, Blanca Pérez, Eloísa Rodríguez *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: leyanis@ibp.co.cu

RESUMEN

El establecimiento de las condiciones de cultivo es imprescindible para regular de manera eficiente la regeneración de plantas de plátano cv. 'FHIA-21' por embriogénesis somática. Es por ello que esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de la densidad de inoculación en la maduración de los embriones somáticos. Para el estudio se adicionaron 0.2, 0.4 y 0.6 gramos de embriones somáticos sobre 60 ml de medio de cultivo semisólido de maduración. Las evaluaciones se realizaron a los 30 días de cultivo con el análisis de las características morfológicas de los embriones, la determinación de la masa fresca (g) y presencia de embriones con exposición de la plúmula. Posteriormente, se determinó el número de embriones germinados y se realizó una caracterización morfológica de su germinación. Los resultados mostraron la influencia de la densidad de inoculación en el incremento de la masa fresca y en la presencia de embriones con exposición de la plúmula. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas con respecto al total de embriones germinados, los valores oscilaron entre 8.4 y 11.2 por frasco de cultivo. A pesar de ello, fue evidente una mejor germinación cuando se empleó 0.4 gMF de embriones somáticos, durante la fase de maduración. A partir de los embriones con germinación completa y parcial se desarrollaron plantas a los 25 y 35 días de cultivo, respectivamente, durante la fase de crecimiento. Estas plantas se caracterizaron por tener una altura entre 3.5 y 4.0 cm, más de tres hojas abiertas y un sistema radical desarrollado. Aspectos que favorecieron una alta supervivencia durante la fase de aclimatización en casa de cultivo.

Palabras clave: embriogénesis somática, germinación, masa fresca, morfológico

Effect of inoculation density on maturation of somatic embryos of plantain cv. 'FHIA-21' (*Musa AAAB*)

ABSTRACT

The establishment of conditions of culture is essential to regulate of efficient way the regeneration of plantain plants cv. 'FHIA-21' by somatic embryogenesis. It is for that reason that this investigation had like objective to determine the effect of the density of inoculation on maturation of somatic embryos. For the study were added 0.2, 0.4 and 0.6 grams of somatic embryos on 60 ml of culture means maturation semisolid. The evaluations were realized to the 30 days of culture with the analysis of the morphologic characteristics of the embryos, the determination of the fresh mass (g) and presence of embryos with exhibition of apical shoot. Later, the number of germinated embryos was determined and a morphologic characterization of its germination was realized. The results showed the influence of the density of inoculation in the increase of the fresh mass and in the presence of embryos with exhibition of apical shoot. Nevertheless, significant differences with respect to the total of germinated embryos did not appear, the values oscillated between 8.4 and 11.2 by bottle of culture. In spite of it, one better germination was evident when the 0.4 embryos were worked to gMF, during the phase of maturation. From the embryos with complete and partial germination plants were developed to the 25 and 35 days of culture, respectively, during the phase of growth. These plants were characterized to have a height between 3.5 and 4.0cm, more than three open leaves and a system to radical developed. Aspects that favoured a high survival during the phase of acclimatization in green house.

Key words: somatic embryogenesis, fresh mass, germination, morphologic

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática se produce en la naturaleza como una de las estrategias evolutivas de la embriogénesis asexual, para

superar diversos factores ambientales y genéticos que impiden la fecundación (von Arnold *et al.*, 2002). Además, puede surgir a partir de células somáticas aisladas *in vitro* después de la inducción experimental. Estas

células frente a estímulos físicos-químicos sustituyen su patrón de expresión génica por un programa de expresión de genes embriogénicos (von Arnold, 2008; Zavattieri *et al.*, 2010).

La regeneración de plantas mediante embriogénesis somática es un proceso de varias fases, que comienzan con la iniciación y proliferación de masa celular proembriogénica, seguida por la formación de embriones somáticos, su diferenciación, maduración, germinación y finalmente la conversión en plantas (von Arnold *et al.*, 2002). La iniciación y la proliferación se producen generalmente en un medio rico en auxina, que induce la diferenciación de las células meristemáticas. Una vez transferido a un medio con bajo o ningún umbral de auxina, estas células pueden convertirse en embriones somáticos. La germinación de los embriones sólo puede ocurrir cuando el embrión está lo suficientemente maduro como para formar brotes apicales y raíces funcionales (von Arnold, 2008).

Al igual que en otras especies de plantas, en plátanos y bananos, el desarrollo de la embriogénesis somática transita por una secuencia de eventos morfogénicos expresados en las diferentes fases de cultivo. Cada una requiere de variaciones en cuanto a las condiciones de cultivo, reguladores de crecimiento, medios de cultivo nutritivos, entre otros aspectos.

Con el propósito de mejorar sincronizar de manera eficiente la regeneración de plantas mediante embriogénesis somática en plátanos y bananos, es importante establecer las condiciones de cultivo en cada una de las fases del proceso. Muchos factores están involucrados en su control y se conoce que la densidad de inoculación es un factor importante. Al respecto, existen evidencias de la influencia de la densidad de inoculación durante la multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. 'FHIA-18' (Barranco *et al.*, 2009). De igual manera, otros autores determinaron su influencia en la frecuencia de formación de embriones somáticos a partir de agregados celulares embriogénicos (García-Águila., 2010; Dai *et al.*, 2010). Sin embargo, es importante entender cómo se desarrolla el embrión

somático hasta alcanzar una maduración que permita su germinación con la conversión en plantas. Aspectos importantes para el empleo de la embriogénesis somática en la propagación masiva de plantas.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descritos, este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la densidad de inoculación en la maduración de los embriones somáticos hasta la germinación y conversión de plantas de plátano cv. 'FHIA-21' (*Musa AAAB*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los embriones somáticos se obtuvieron a partir de suspensiones celulares embriogénicas del cv. de plátano 'FHIA-21', con seis meses de edad en fase de multiplicación. Para la formación de los embriones se extrajeron 200 µl de células (20-25 mg de masa fresca) y se depositaron en mallas de poliestireno con un tamaño de (2.0 cm²) y poros de 100 micrómetros, las cuales retuvieron las células y dejaron salir el exceso de medio de cultivo. Las mallas se colocaron sobre el medio de cultivo de formación de embriones propuesto por Dhed'a *et al.* (1991).

Después de 25 días de cultivo, los embriones somáticos formados se transfirieron a medio de cultivo de maduración, en frascos plásticos de 500 ml de capacidad total. Este contiene el 100% de las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), 0.2 mg l⁻¹ de 6-BAP, 0.5 mg l⁻¹ de AIA, 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 3.0 g l⁻¹ de Gelrite® (DUCHEFA).

Efecto de la densidad de inoculación en la maduración de los embriones somáticos

Para comprobar el efecto de la densidad de inoculación en la maduración de los embriones somáticos se estudiaron tres densidades. Para ello, se adicionaron 0.2, 0.4 y 0.6 gramos de masa fresca (gMF) de embriones en 60 ml de medio de cultivo de maduración. Los embriones se distribuyeron sobre toda la superficie del medio y cada frasco constituyó una réplica. Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado, donde se establecieron 10 réplicas por cada tratamiento.

Los frascos se colocaron a $27 \pm 2.0^\circ\text{C}$ de temperatura, en cámara de crecimiento de luz artificial (tubos fluorescentes de luz blanca) con fotoperiodo de 16 horas de luz y densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $62\text{-}68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

A los 30 días de cultivo, se evaluó el aspecto morfológico de los embriones somáticos y se determinó el número de embriones con exposición de la plúmula. Además, se evaluó la masa fresca final (gMF) de los embriones y se calculó su coeficiente de multiplicación con respecto a la masa fresca inicial de inoculación (gMF). Para ello, se utilizó la siguiente expresión matemática: Coeficiente de multiplicación = masa fresca final (g) / masa fresca inicial de inoculación (g).

Germinación de los embriones somáticos

Para la germinación se inoculó un gramo de embriones somáticos maduros en el medio de cultivo propuesto por Kosky *et al.* (2000), con modificaciones por la ausencia del Biobrás-6. Se establecieron 10 réplicas por cada tratamiento y las condiciones de cultivos fueron las mismas empleadas durante la fase de maduración.

A los 45 días de cultivo, se observaron las características morfológicas de los embriones germinados y se describieron los principales aspectos relacionados con la germinación. Además, se cuantificó el total de embriones con germinación completa y parcial. En este sentido, se consideró la presencia de hojas abiertas, pseudotallo definido y raíces como una germinación completa; y como germinación parcial a los embriones que mostraban una elongación del ápice meristemático con formación del pseudotallo y presencia de raíces; pero sin la expansión de las hojas.

Posteriormente, los embriones somáticos con ambos tipos de germinación (completa y parcial) se colocaron en medio de cultivo de crecimiento para el desarrollo de las plantas. Este medio de cultivo está compuesto por las sales MS, 100 mg l^{-1} de mio-inositol, 30 g l^{-1} de sacarosa y 3.0 g l^{-1} de Gelrite® (DUCHEFA). Después de 30 días, las plantas se llevaron a condiciones *ex vitro* en casa de cultivo donde permanecieron durante 70 días, antes de su traslado al campo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete computacional Stat Graphics versión 5.0 sobre Windows. Inicialmente, se efectuó la comprobación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas. La comparación de los valores medios correspondientes a las variables: número de embriones con exposición de la plúmula y masa fresca final se realizaron mediante la prueba de Tukey y el coeficiente de multiplicación se comparó con la prueba de *Kruskall Wallis*. Por otra parte, los valores medios correspondientes al total de embriones con germinación completa y parcial se compararon a través de la prueba Tukey. Ambas pruebas se efectuaron con un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al finalizar la fase de maduración se observaron cambios en el aspecto morfológico de los embriones somáticos, los cuales de manera general, no mostraron relación con las densidades de inoculación estudiadas. En todos los tratamientos, se observó un incremento en el tamaño de los embriones, la presencia de embriones de color blanco opaco, otros de apariencia traslúcida, y otros con exposición de la plúmula. Además, se observó embriogénesis secundaria con la formación de proembriones y embriones en etapa globular a partir de los existentes. Este aspecto se presentó con mayor evidencia en los embriones somáticos pertenecientes a la densidad de inoculación de 0.6 gMF por frasco. En este contexto, las densidades de cultivo de 0.4 y 0.6 gMF mostraron embriones con presencia de pelos absorbentes o tricomas sobre toda la superficie, característica que puede atribuirse a modificaciones de las células de la epidermis producto de las condiciones de cultivo (Figura 1).

Los valores correspondientes a la masa fresca final y al número de embriones con plúmula, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los embriones con mayor masa fresca al finalizar la fase de maduración pertenecen al tratamiento donde se inocularon 0.6 gMF, con diferencias significativas con el resto de las densidades de cultivo. Al mismo tiempo, estas densidades (0.2 y 0.4 gMF) mostraron

diferencia significativas entre ellas. Estos resultados indicaron un aumento lineal de la masa fresca con respecto al incremento de la densidad de inoculación utilizada para el cultivo de los embriones. Sin embargo, el análisis de los valores correspondientes al coeficiente de multiplicación de la masa fresca, indicó que no existieron diferencias significativas entre las densidades de inoculación (Figura 2).

Al respecto, se puede concluir que la causa del incremento de la masa fresca de los embriones fue la misma para las tres densidades de cultivo. Este incremento en la masa de los embriones puede estar dado por la absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo, lo cual debe desencadenar los procesos de expansión celular, acumulación de sustancias de reserva y posterior diferenciación de los embriones en etapas avanzadas de desarrollo.

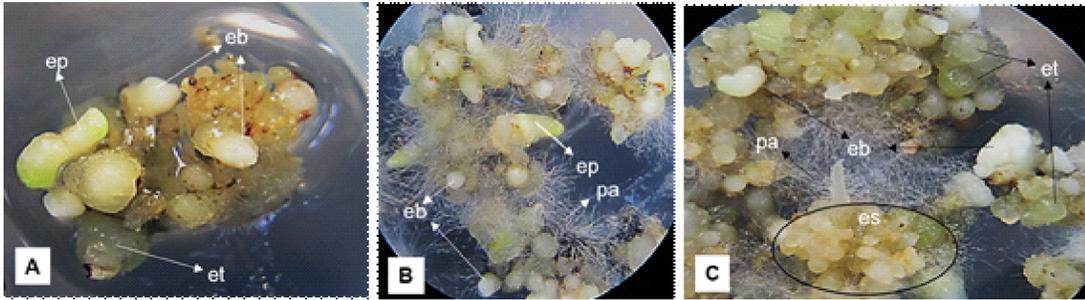
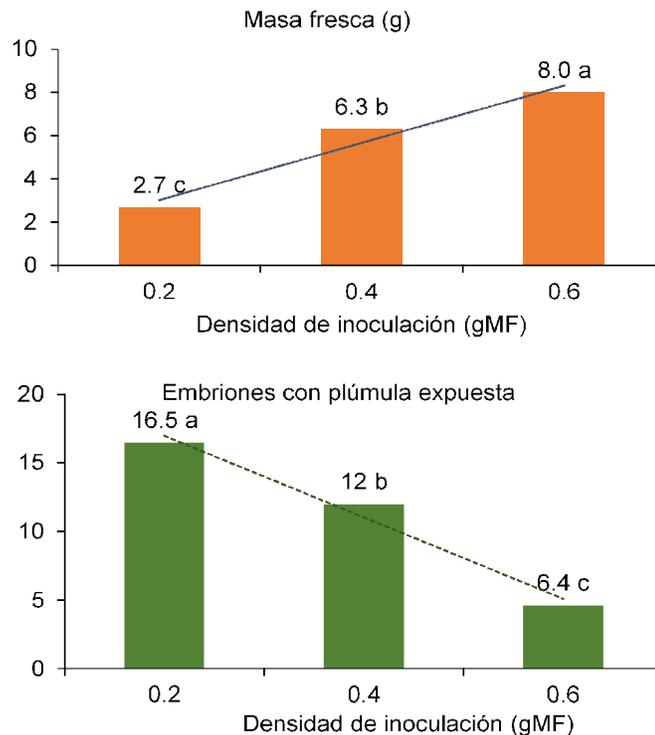


Figura 1. Embriones somáticos de plátano cv. 'FHIA-21' (AAAB) a los 30 días de cultivo en fase de maduración. A y B: Embriones provenientes de 0.2 y 0.4 gMF mostrando la plúmula (ep), embriones de color blanco opaco (eb), embriones traslúcidos (et) y embriones con pelos absorbentes sobre la superficie (pa). C: Embriones provenientes de 0.6 gMF con presencia de eb, et, pa y embriogénesis secundaria (es).



Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas entre las medias según la prueba Tukey para $p \leq 0.05$.

Figura 2. Influencia de la densidad de inoculación en la masa fresca y en el número de embriones somáticos de plátano cv. 'FHIA-21' (AAAB) con plúmula a los 30 días de cultivo en fase de maduración.

Por otra parte, la presencia de embriones con plúmula fue mayor cuando se utilizó la menor densidad de inoculación (0.2 gMF), con diferencias significativas con respecto a 0.4 y 0.6 gMF. De igual forma, estas densidades mostraron diferencias significativas entre ellas. Esta característica de los embriones se reconoce en la literatura como germinación temprana y en este estudio, los resultados evidenciaron una relación inversa entre el incremento de germinación temprana de los embriones y la densidad de inoculación utilizada para el cultivo (Figura 2).

Al concluir la fase de germinación, se observaron diferentes patrones morfológicos relacionados con la germinación de los embriones. Entre ellos se encontraban embriones con germinación completa, con hojas abiertas, pseudotallo definido y raíces (Figura 3A), otros mostraron una elongación del ápice meristemático con formación

del pseudotallo, sin la expansión de hojas y presencia de raíces (germinación parcial) (Figura 3B). También, se encontraron embriones germinados sin una definición del pseudotallo donde las hojas permanecían abiertas y lanceoladas (Figura 3C).

En este estudio, la presencia de los diferentes patrones morfológicos relacionados con la germinación de los embriones no tuvo relación con la densidad de inoculación utilizada durante la fase de maduración. Estos se observaron en todos los tratamientos. De igual manera, la cuantificación del total de embriones germinados fue similar en cada una de las densidades de inoculación estudiadas. Los valores promedios oscilaron entre 8.4 y 11.2 por frasco de cultivo, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 4). Similar respuesta tuvo la presencia de embriones con germinación completa y parcial.



Figura 3. Embriones somáticos germinados de plátano cv. 'FHIA-21' (AAAB), a los 45 días de cultivo. Embriones con germinación completa (A) y parcial (B). Embriones sin definición del pseudotallo con hojas abiertas y lanceoladas (C).

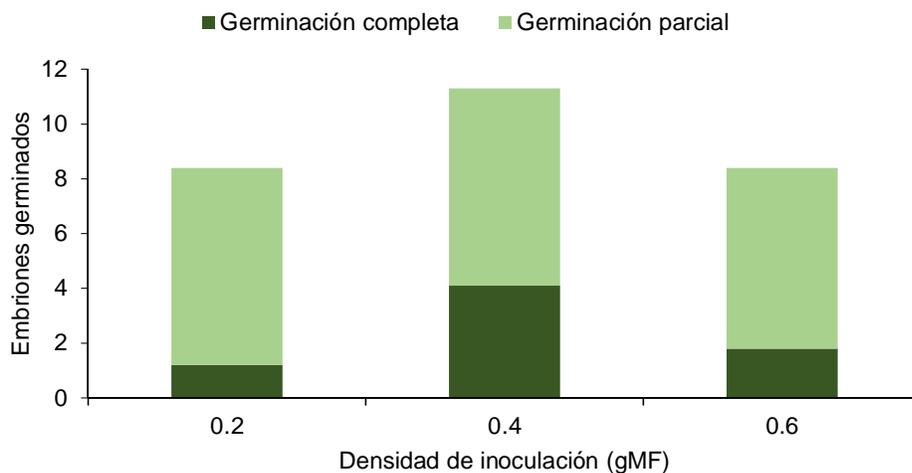


Figura 4. Influencia de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de plátano cv. 'FHIA-21' (AAAB), a los 45 días de cultivo.

El número de embriones con germinación completa no mostró diferencias significativas entre las densidades de inoculación estudiadas. Estos valores fueron 1.2, 1.8 y 4.0 para las densidades de 0, 2, 0.4 y 0.6 gMF, respectivamente. Similar respuesta tuvo la cuantificación de la germinación parcial de los embriones, sus valores oscilaron entre 6.2 y 7.2. A pesar de ello, fue evidente una mejor germinación cuando los embriones fueron cultivados a 0.4 gMF, durante la fase de maduración. Por esta razón, se recomienda el empleo de esta densidad para esta fase del cultivo.

A partir de los embriones con germinación completa y parcial se desarrollaron plantas a los 25 y 35 días de cultivo, respectivamente, durante la fase de crecimiento. Estas plantas se caracterizaron por tener una altura entre 3.5 y 4.0 cm, más de tres hojas abiertas y un sistema radical desarrollado. Aspectos que favorecieron una alta supervivencia durante la fase de aclimatización en casa de cultivo (Figura 5 A y B). Sin embargo, no se desarrollaron plantas con características morfológicas adecuadas a partir de los embriones que mostraron patrones morfológicos fuera de tipo durante la fase de germinación (Figura 3 C).

La densidad de inoculación es un factor que ha sido relacionado con mecanismos que controlan la diferenciación celular en el proceso de embriogénesis somática. En *Musa* spp. se ha demostrado su influencia en la formación y desarrollo morfológico de los embriones en medio de cultivo líquido (Cabrera *et al.*, 2002; Barranco *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2010), así como

en la sincronización del proceso embriogénico (García-Águila *et al.*, 2010).

Los estudios realizados durante la fase de maduración han estimado la culminación del desarrollo morfológico de los embriones somáticos a través de su germinación (Kosky *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 2002). En este estudio, la diversidad de cambios en el aspecto morfológico de los embriones evidencia el carácter asincrónico del cultivo embriogénico. Es por ello, que se tomó la formación de la plúmula como una característica distintiva de la madurez del embrión que puede influir en su germinación.

De acuerdo con la información existente, durante el proceso de embriogénesis somática se producen una serie de cambios morfogénicos asociados a las etapas de desarrollo del embrión somático. Una vez que se forman los embriones se produce un cambio notable en el programa de desarrollo del embrión dirigido a una mayor expansión de las células y el almacenamiento de sustancias de reserva (Von Arnol, 2008).

Hasta donde se conoce, no existe un consenso con respecto a un marcador morfológico que identifique a un embrión maduro en *Musa* spp. y su correspondencia con una adecuada germinación. En estudios relacionados con la influencia de la densidad de inoculación en la formación de embriones somáticos del banano cv. 'Da Jiao', se consideró como embrión maduro a los que presentaron de 2.0 a 3.0 mm de diámetro con definición de los polos meristemáticos y radiculares. Sin embargo, su tasa de germinación fue del 40% y aproximadamente el 23% se convirtieron en plantas (Dai *et al.*, 2010).



Figura 5. Plantas obtenidas a partir de los embriones de plátano cv. 'FHIA-21' (AAAB). (A) Plantas en medio de cultivo de crecimiento a los 30 días de cultivo. (B) Plantas en fase de aclimatización.

En este sentido, Husin *et al.* (2014) observaron que los embriones globulares traslucidos se convirtieron en estructuras compactas de color blanco opaco cuando maduraron en medio de cultivo que contenía 400 mg de L- glutamina y más tarde regeneraron plantas morfológicamente normales. Estos autores destacaron la presencia de anomalías en la germinación de los embriones con el incremento de la concentración de prolina en el medio de cultivo.

En este estudio, el incremento de la masa fresca y la presencia de embriones con plúmula no se correspondieron con un aumento de la germinación de los embriones. Por esta razón, se recomienda la utilización de bajas densidades (0.2 a 0.4 gMF) para la fase de maduración de los embriones de plátano cv. 'FHIA-21' (AAAB).

Con el propósito de preparar a los embriones para la germinación se debe profundizar en el estudio de otros factores que garanticen una mejor maduración del embrión, con la síntesis de sustancias de almacenamiento, la inducción de la pérdida de agua y el estado de latencia que se requiere previo a la germinación y formación de plantas morfológicamente adecuadas.

CONCLUSIONES

Los resultados permitieron analizar la influencia de la densidad de inoculación en la maduración de los embriones y su posterior germinación y conversión en plantas del cv. de plátano 'FHIA-21'. Se demostró que la densidad de inoculación utilizada durante la fase de maduración influyó en el incremento de la masa fresca y en la presencia de embriones con plúmula. Sin embargo, no se incrementó el número de embriones germinados. La presencia de embriones con germinación fuera de tipo sugiere continuar el estudio de otros factores que proporcionen una mejor maduración para sincronizar de manera eficientemente la regeneración de plantas por embriogénesis somática.

REFERENCIAS

Barranco, LA, Gómez-Kosky R, Reyes M, Posada L, Frerie 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

Cabrera, M, López J, Kosky RG, Montano N, Reyes M, Reinaldo D, Ventura JC, Medero V, Santos A, García M, Basail M, Espinosa E (2002) Multiplicación, histodiferenciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas en plátanos vianda 'Navolean' (AAB). Biotecnología vegetal 2(2): 115-117

Dai, XM, Xiao W, Huang X, Zhao JT, Chen YF, Huang X (2010) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts of dessert banana cv. 'Da Jiao' (*Musa paradisiacal* ABB Linn.) via somatic embryogenesis. *In Vitro* Cell. Dev. Biol-Plant 46(5): 403-410

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

García-Águila, L, Kosky R, Alvarado-Capó Y, Sarría Z, Reyes M (2010) Efecto de la densidad de inoculación en la formación y morfología de los embriones somáticos de plátano (*Musa* spp. AAAB, cv. híbrido FHIA-21). Revista Colombiana de Biotecnología XII (2): 240-247

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

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497

von Arnold, S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249

von Arnold, S (2008) Somatic embryogenesis. En: George EF, Hall MA y De Klerk GJ, *Plant Propagation by Tissue Culture* (Eds.), 3rd Edition, Volume 1. Springer. Dordrecht pp. 335-354

Zavattieri, MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1) 4

Recibido: 17-01-2014
Aceptado: 13-03-2014