

Embriogénesis somática en bananos y plátanos partiendo de flores masculinas inmaduras

Rafael Gómez Kosky^{*1}, Luis del Sol², Maritza Reyes Vega¹, Marisol Freire Seijó¹, Laisyn Posada Pérez¹, Idalia Herrera¹, Jean Vicent Escalant³ *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 1/2. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: rgkosky@uclv.etecsa.cu

² Instituto Nacional de Viandas Tropicales. INIVIT. Santo Domingo. Villa Clara

³ INIBAP. Montpellier, Francia.

RESUMEN

En el desarrollo de este trabajo se estudiaron aspectos relacionados con la obtención de embriones somáticos y la regeneración de plantas en algunos cultivares de *Musa* sp., grupos AAA, ABB y AABB. Se realizaron diferentes experimentos para determinar las condiciones de cultivo óptimas, el gelificante y dosis adecuada de 2,4-D; así como el rango de los nodulos florales. El mejor gelificante resultó ser el phytigel (SIGMA Co.), a una concentración de 2.0 g.l⁻¹ donde se logró que el 68.6% de los explantes formaran callos nodulares amarillentos. Con respecto a las condiciones de incubación, la oscuridad tuvo un mejor efecto logrando que el 73.8% de los explantes formaran callos nodulares amarillentos. Pudo determinarse la mejor dosis de 2,4-D para la inducción de los callos nodulares amarillentos en cada uno de los cultivares estudiados: Gran Enano (AAA), Parecido al Rey (AAA) y FHIA-03 (AABB) 4.0 mg.l⁻¹ y para el Bluggoe (ABB) 2.0 mg.l⁻¹. Al estudiar los rangos de las manos se encontró para todos los cultivares que el grupo de rangos del 5-9 formó más callos con embriogénesis somática de alta frecuencia que los rangos del 10-14. Una vez transferidos los embriones somáticos al medio de cultivo de germinación, se logró un 48.0% de germinación para el cultivar Gran Enano y 39.0% para Parecido al Rey.

Palabras clave: banano, callos, embrión somático, flores masculinas

ABSTRACT

In the development of this work, aspects related to the achievement of somatic embryos and regeneration of plants in some cultivars of *Musa* sp. group AAA, ABB and AABB were studied. Different experiments were carried out to determine the optimum culture conditions; the solidifying agent resulted to be phytigel (SIGMA Co.), at a concentration of 2.0 g.l⁻¹, were 68.6% of the explants formed yellow nodular calli. With, respect to the incubation conditions, darkness had a better influence achieving 73.8% of the explants forming yellow nodular calli. The best dosage of 2,4-D could have been determined for the induction of the yellow nodular calli in each one of the cultivars studied: Grande Naine (AAA), Parecido al Rey (AAA) and FHIA-03 (AABB) 4.0 mg.l⁻¹ and for Bluggoe (ABB) 2.0 mg.l⁻¹. Studying the ranges of the hands, it was found that for all the cultivars, the ranges from 5-9 formed more callus with somatic embryogenesis of high frequency than the ranges from 10-14. Once the somatic embryos were transferred to the germination culture medium, a rate of 48.0% was obtained for Grande Naine and 39.0% for Parecido al Rey.

Key words: banana, callus, male flowers, somatic embryo

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos son una importante fuente alimenticia en las regiones productoras de América Tropical y constituyen a nivel mundial el principal alimento para cerca de 400 millones de personas, con una producción anual de 80 millones de toneladas (FAO, 1999). La incidencia de numerosas enfermedades tales como la Sigatoka Negra y el Mal de Panamá, algunas virosis y nemátodos han afectado considerablemente la producción de plátanos y bananos y su costo, lo cual convierte a la obtención de nuevas variedades en una prioridad urgente. Además el virus Bunchy Top del banano, (considerado como el virus que más daños

económicos causa a estas plantaciones), puede tornar las plantas completamente improductivas (Dale *et al.*, 1993). Según Sági *et al.* (1994), el costo anual para el control químico de la Sigatoka Negra se encuentra entre 0.3 y 1.0 USD por planta para eliminar pérdidas entre un 30 y 50% en plantaciones de bananos.

Desde hace aproximadamente 60 años se han desarrollado diferentes programas de mejoramiento genético, sin embargo debido a la esterilidad de los cultivares triploides, la obtención de nuevas variedades por mejoramiento convencional ha sido difícil. Dentro de las técnicas de la biotecnología la transformación genética permite la introducción de genes para la

resistencia a enfermedades. La mayor limitante en el uso de esta técnica consiste en la regeneración eficiente de plantas completas a partir de células somáticas o protoplastos (Sagi *et al.*, 1994).

Los embriones somáticos son materiales excelentes para la introducción de genes por medio de la ingeniería genética, así como para la inducción de mutaciones; además, se recomienda como un material muy apropiado para estudios de selección *in vitro* usando toxinas de hongos (Parrot, 1993). La integración de estas técnicas a los programas de mejoramiento genético ayudaría a superar las barreras existentes para la completa utilización del acervo genético del género *Musa*.

Basado en esta problemática es que se desarrolló el

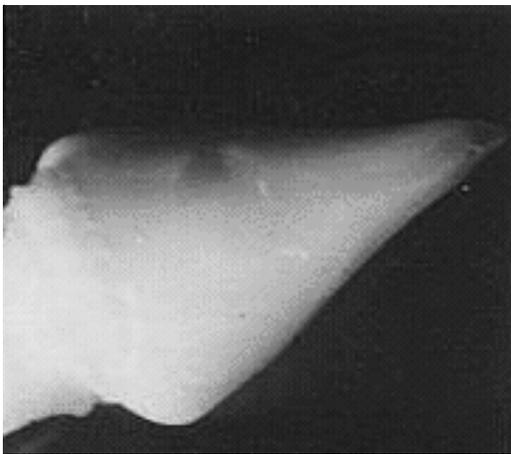


Figura 1A. Pámpana reducida a un tamaño de 3 cms (6x) y lista para ser desinfectada.

Como explantes para la formación de estos callos se tomaron los fascículos de flores masculinas, “manos”, del rango 5 al 14 (Fig. 1B). Para determinar el rango de las “manos” se consideró el meristemo floral como cero. Las “manos” se implantaron en frascos de cultivo de 250 ml con 40 ml del medio de cultivo de inducción propuesto por Escalant *et al.* (1994) el cual estaba formado por las sales y vitaminas Murashige y Skoog (1962) MS, suplementadas con 1.0 mg.l⁻¹ de AIA; 1.0 mg.l⁻¹ de ANA; 30.0 g.l⁻¹ de sacarosa y pH 5.8 antes del autoclaveado.

Se realizaron un total de cuatro experimentos donde se probaron diferentes gelificantes (agargel, phytigel y agarosa, SIGMA Co.), condiciones de iluminación: luz artificial con fotoperíodo de 16 horas de luz, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 42-48 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y temperatura de 26 \pm 2°C luz solar con fotoperíodo de 13 horas y 34 minutos de luz y 10 horas y 24 minutos de oscuridad,

presente trabajo que tuvo como objetivo estandarizar la metodología de embriogénesis somática a partir de flores masculinas como explantes en diferentes cultivares de bananos y plátanos de cocción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la extracción de los explantes se emplearon inflorescencias masculinas (“pámpanas”) de los cultivares: *Musa* AAA cvs. Gran Enano y Parecido al Rey, *Musa* ABB cv. Bluggoe y *Musa* AABB cv. FHIA 03. A las pámpanas se le eliminaron las brácteas exteriores y flores hasta dejarlas aproximadamente de un tamaño de 3 cm (Fig.1A), posteriormente se desinfectaron con etanol al 70.0% (v/v) durante 15 minutos.

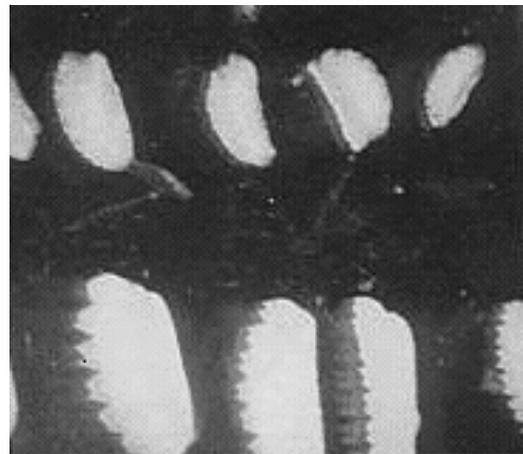


Figura 1B. Manos de flores de los rangos de la 5 al 14 (12x) utilizadas como explantes.

con una DFFF de 48 - 62.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y temperatura de 26 \pm 2 °C y oscuridad constante con una temperatura de 27 \pm 2 °C), dosis de 2,4-D (1.0, 2.0, 4.0 y 6.0 mg.l⁻¹) y la influencia combinada de dos rangos de las manos (grupos del 5 al 9 y del 10 al 14) con dos concentraciones de 2,4-D (2.0 y 4.0 mg.l⁻¹), con el objetivo de estandarizar el método propuesto por Escalant *et al.* (1994) para el cultivar Gran Enano y desarrollarlo para los cultivares Parecido al Rey, Bluggoe y FHIA-03.

Para los tres primeros experimentos se evaluó la formación del callo nodular amarillento entre los tres o cuatro meses de cultivo y para el cuarto se evaluó la formación de callos con embriogénesis somática de alta frecuencia entre los cinco o seis meses de cultivo.

Con el objetivo de evaluar la germinación de los embriones obtenidos, grupos de embriones somáticos de los cultivares Gran Enano y Parecido

al Rey fueron utilizados. La regeneración en plantas de los embriones somáticos se realizó empleando el medio de cultivo propuesto por Escalant *et al.* (1994), compuesto por las sales MS, vitaminas Morel (1950); 0.5 mg.l⁻¹ de 6 bencilaminopurina (6BAP), 1.0 mg.l⁻¹ de AIA, 30.0 g.l⁻¹ de sacarosa y solidificado con phytigel 2.0 g.l⁻¹ sobre el cual se colocó un papel de filtro para disminuir la incidencia de anomalías de los embriones somáticos durante este proceso de cultivo. Se evaluó el porcentaje de embriones que formaron plántulas respecto al número de embriones somáticos colocados en los frascos de cultivo a los 40 días. Se adicionaron 30 ml por frasco de vidrio, los cuales tenían una capacidad total de 250 ml.

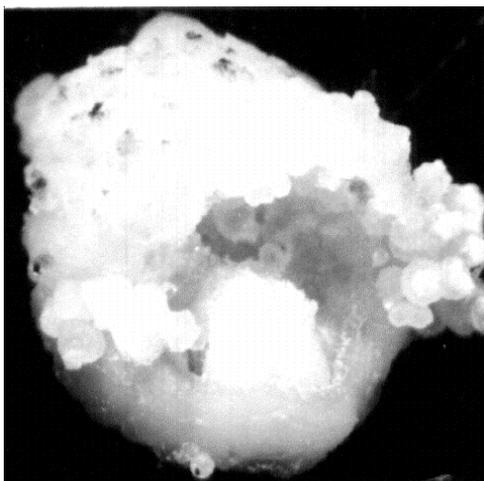


Figura 2A. Callo amarillento en el cv. Parecido al Rey formado a los cuatro meses de cultivo (12X)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los cuatro meses de cultivo las flores respondieron formando un callo de color amarillento (Fig. 2A). Después entre los cinco y seis meses sin realizar subcultivo, un callo traslúcido con embriogénesis somática de alta frecuencia se formó sobre el callo amarillento (Fig. 2B) y se observó la formación de numerosos embriones somáticos en etapa globular en su superficie (Fig. 2C). Estos embriones se observaron como pequeñas estructuras blanquecinas y lisas. Este proceso embriogénico coincidió con lo descrito por Escalant *et al.* (1994) y Bieberach (1995).

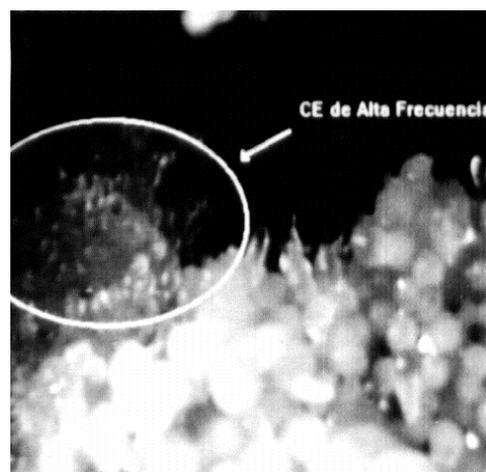


Figura 2B. Callo traslúcido con embriogénesis somática de alta frecuencia (16X)



Figura 2C. Embriones somáticos del cv. Parecido al Rey formados sobre el callo traslúcido (25X)

Al comparar el efecto de los diferentes tipos de gelificantes (phytagel, agarosa y agargel) sobre la

formación del callo nodular amarillento, se comprobó que el mayor porcentaje de callos nodulares se formaron al emplear el phytigel, como se observa en la figura 3.

Los resultados alcanzados al emplear el phytigel pueden atribuirse a su mayor pureza comparándolo con los otros gelificantes estudiados Li *et al.* (1988), o su mayor contenido de iones de potasio y magnesio (Pasqualetto *et al.* 1988) elementos de gran importancia en el crecimiento celular, o también a sus mayores facilidades para el intercambio de sustancias con el tejido del explante (Duchefa, 1994).

Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Tou Shii *et al.* (1992) quienes describieron buenos resultados al emplear el phytigel como gelificante para la formación de callos con tejido embriogénico a partir de flores masculinas inmaduras del cultivar Gran Enano (AAA). También Mathews *et al.* (1993); pero en yuca (*Manihot esculenta* Crantz), al utilizar hojas para la formación de callos y embriones somáticos obtuvieron mejores resultados al emplear phytigel como gelificante

de los medios de cultivo que con agarosa y agar purificado. Los resultados obtenidos en este experimento sugieren que el phytigel puede reemplazar a la Agarosa (gelificante reportado por Escalant *et al.*

(1994) para la realización de este evento embriogénico), sin riesgo de disminuir la eficiencia de formación de callos amarillentos en estos cultivares bajo las condiciones estudiadas.

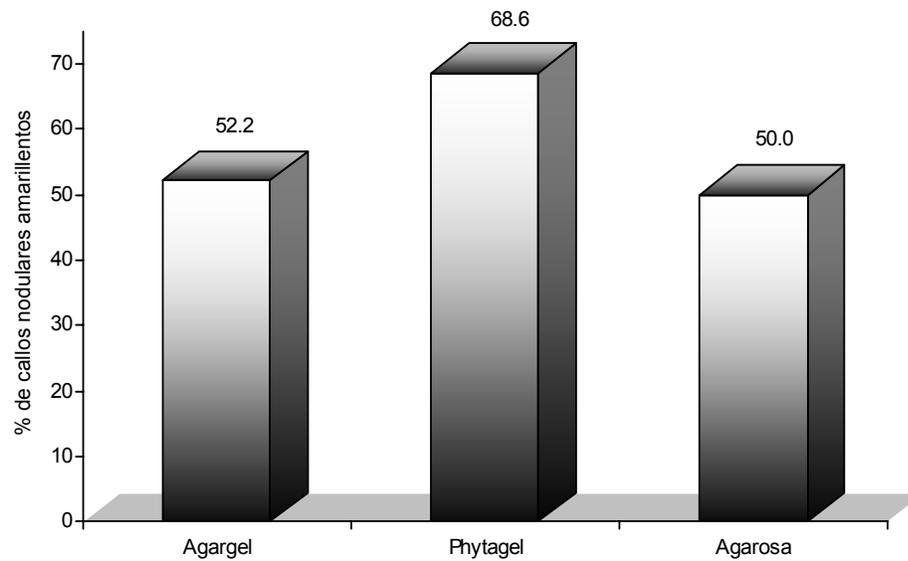


Figura 3. Efecto de diferentes agentes gelificantes sobre la formación de callos nodulares amarillentos.

Al comparar las diferentes condiciones de iluminación se comprobó que la oscuridad favoreció la formación del callo nodular amarillento, con

resultados superiores a la luz artificial y solar en las condiciones ensayadas, como puede observarse en la figura 4.

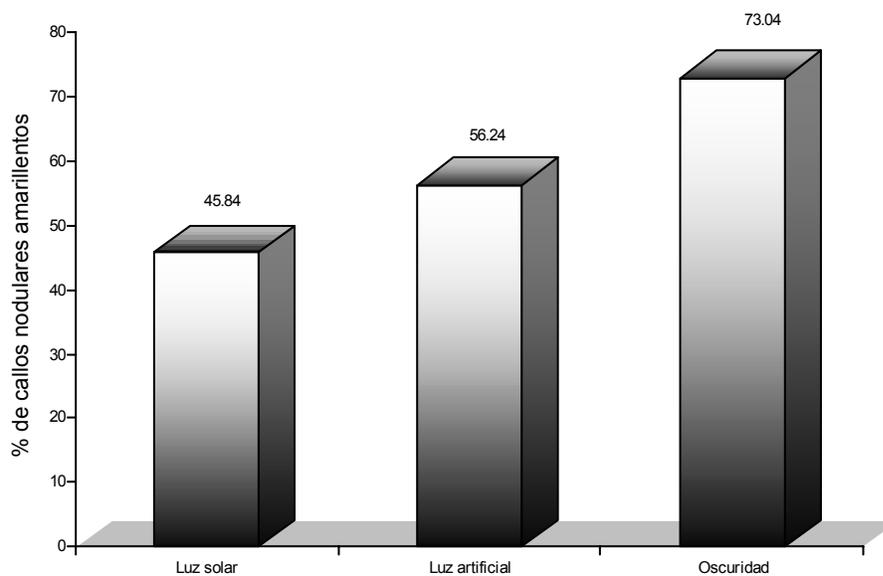


Figura 4: Efecto de las condiciones de incubación sobre la formación de callos nodulares amarillentos, para los cultivares estudiados.

Los mejores resultados alcanzados en la oscuridad pueden deberse al conocido efecto degradativo de la luz sobre las auxinas, el cual no ocurre en condiciones de oscuridad.

Algunos autores como Novak *et al.* (1989) y Gómez *et al.* (1995) también emplearon la oscuridad para la formación de tejido embriogénico de *Musa spp.* Sin embargo Escalant *et al.* (1994), Bieberach (1995) y Grapin *et al.* (1998 y 2000), formaron los callos con embriogénesis somática de alta frecuencia partiendo

de flores inmaduras masculinas y femeninas de diferentes cultivares de plátanos y bananos en condiciones de luz artificial.

Al evaluar el efecto de diferentes dosis de 2,4-D, sobre la formación de callos nodulares amarillentos en los cuatro cultivares estudiados, se obtuvo que de forma general todos respondieron con los mejores resultados a las dosis de 2.0 y 4.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D (Tabla 1). Solamente el FHIA-03 tuvo la mayor respuesta con 4.0 mg.l⁻¹ de esta auxina.

Tabla 1: Influencia de la interacción cultivar-dosis de 2,4-D sobre la formación de callos nodulares amarillentos de *Musa spp.* a los cuatro meses de cultivo.

| Cultivares | Dosis de 2,4-D (mg.l ⁻¹) | | | |
|------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|------------|
| | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 6.0 |
| Gran Enano (AAA) | 10.60 cde | 13.60 abc | 15.20 a | 11.20 bcde |
| P. al Rey (AAA) | 8.00 e | 13.60 abc | 14.40 ab | 9.39 de |
| Bluggoe (ABB) | 8.60 e | 15.40 a | 13.20 abc | 8.00 e |
| FHIA-03 (AABB) | 8.60 e | 10.00 cde | 12.80 abc | 10.40 cde |

MG ± ES : 11.43 ± 0.75

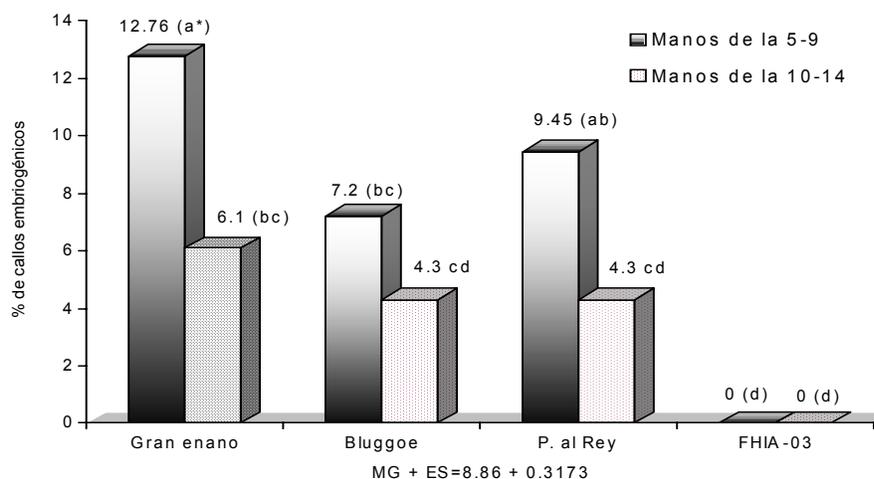
Letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey para $p < 0.05$

Estos resultados apoyan los descritos por Escalant *et al.* (1994) quienes señalaron que la respuesta de las flores masculinas inmaduras a la formación de callos está fuertemente influenciada por el genotipo, también Bieberach (1995) y Grapin *et al.* (2000) obtuvieron similares resultados tanto al utilizar flores masculinas como femeninas en *Musa*.

Este resultado coincide con los obtenidos por Escalant *et al.* (1994) y Bieberach (1995) quienes encontraron

que la dosis de 4 mg.l⁻¹ de 2,4-D indujo el mayor número de callos nodulares amarillentos, al estudiar el cultivar Gran Enano (AAA).

Al analizar el efecto de la combinación, los dos rangos de las manos y los cuatro cultivares sobre la formación de callos con embriogénesis somática de alta frecuencia, pudo comprobarse que los dos grupos de rangos estudiados no respondieron igual para cada uno de los cultivares estudiados, como se observa en la figura 5.



*Letras distintas difieren estadísticamente para Tukey al 5 %.

Figura 5: Efecto de la interacción Cultivar-Rango de las manos, sobre la formación de callos con embriogénesis somática de alta frecuencia en *Musa spp.*

Los cultivares Gran Enano y Parecido al Rey presentaron diferencias significativas entre la respuesta para los dos grupos de rangos, siendo el grupo del cinco al nueve en que se formó la mayor cantidad de callos con estructuras embriogénicas (Fig. 5); mientras que para el cultivar Bluggoe no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos de rangos. En el caso del cultivar FHIA-03 no fue posible obtener callos con embriogénesis somática de alta frecuencia en ninguno de los dos grupos de rangos estudiados.

Los resultados del presente trabajo en cuanto a la mejor respuesta embriogénica presentada por las manos de los rangos del cinco al nueve, encontradas en los cultivares Gran Enano y Parecido al Rey, puede estar causado por el estado más indiferenciado del tejido de estos explantes en comparación con el otro grupo de rangos (10-14), lo cual favorece la respuesta embriogénica de los explantes (Parrott, 1993). Esto coincidió con los resultados obtenidos por Escalant *et al.* (1994) y

Bieberach (1995), al estudiar diferentes cultivares de *Musa* spp.

La respuesta diferente de los clones Bluggoe y FHIA-03, este último al extremo de no formar embriones somáticos en ninguno de los 171 callos nodulares formados, se pudo explicar tomando como base la diferente habilidad de cada genotipo para desencadenar las rutas embriogénicas (Parrott, 1993). Escalant *et al.* (1994) no lograron formar callos con estructuras embriogénicas al utilizar el cultivar Pelipita (*Musa* ABB), después de haber logrado que el 17% de los explantes formaran callos nodulares amarillentos.

En el medio de cultivo de germinación, pasadas las seis semanas, ya se contaba con plántulas completas (Figura 6A) logrando una tasa de germinación de aproximadamente 39% para el cultivar Parecido al Rey y 48% para el Gran Enano. Las mismas terminaron su crecimiento al transferir las pequeñas plántulas a un medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento (Figura 6B).

Figura 6A. Plántula completa del cv. Parecido al Rey germinada a partir un embrión somático en medio de cultivo semisólido.

Figura 6B. Plantas de Gran Enano regeneradas de embriones somáticos a los 50 días de cultivo.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron callos con embriogénesis somática de alta frecuencia en los cultivares de *Musa* AAA, Gran Enano y Parecido al Rey y el cultivar *Musa* ABB Bluggoe, obteniendo como mejores explantes las flores masculinas inmaduras de los rangos del cinco al nueve, no ocurriendo así para el cultivar *Musa* AABB FHIA-03, donde no fue posible obtener estos cultivos embriogénicos a las concentraciones estudiadas de 2,4-D.

Las dosis de 2 y 4 mg.l⁻¹ de 2,4-D resultaron las más

apropiadas para inducir callos con estructuras embriogénicas en el cultivar Bluggoe, mientras que para los cultivares Gran Enano y Parecido al Rey fue la de 4.0 mg.l⁻¹.

Se logró la regeneración de plantas completas de los cultivares Gran Enano y Parecido al Rey, con tasas de germinación de 48 y 39% respectivamente.

REFERENCIAS

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.

- Dale, J, Burns T, Oehlschlager S, Karan M y Harding R (1993) Banana bunchy top virus: prospects for control through biotechnology. En: Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica). Proceedings. Montpellier, Francia. pp. 85-92
- Duchefa. (1994) Gelrite. En: Duchefa Biochemicals Plant Cell and Tissue Culture. Catalogue 1994. Duchefa Biochemie BV. Holanda. pp. 120
- Escalant, JV, Teisson, C y Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 1818-186
- FAO (1999) Boletín Trimestral de Estadística. 12(34)
- Gómez, R, Gerth A, Garcia L, Freire M, Perez B, Herrera (1995) Obtención de callos y regeneración de plantas en diferentes clones de plátanos y bananos (*Musa* spp.). *Agronomía Tropical (Venezuela)* 4: 23-26
- Grabin, A, Ortíz JL, Domergue R, Babeau J, Monmarson S, Escalant JV, Teisson C y Cote, F. (1998) Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flowers of *Musa*. *Infomusa* 7: 13-15
- Grabin, A, Ortíz JL, Lescot T, Ferriere N y Cote F (2000) Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain (*Musa* AAB). En imprenta
- Li, HC, Van Gundy, R, Murashige, T (1998) Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales. En: Cultivos de Tejidos Vegetales Aplicados a la Producción Agrícola. (Ed.) Villegas L. CAF. Instituto Internacional de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela, pp. 27-38
- Mathews, H, Schopke C, Carcamo R, Chavarriaga P, Fauquet C, Beachy RN (1993) Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Report*, 12:328-333
- Murashige T. y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant.* 15:473-497
- Novak, F J, Afza R, Van Duren M, Perea-Dallos M, Conger BV, Tang X (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspensions cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Biotechnology* 7: 154-159
- Parrott, W (1993) Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica). Proceedings. Montpellier, Francia. pp. 183-191
- Pasqualetto, PL, Zimmerman HR, Fordham I (1988) The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 14: 31-40
- Sagi, L, Remy S, Panis B, Swennen R y Volckaert G (1994) Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. 'Bluggoe', ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenetic cell suspensions. *Plant Cell Report* 13: 262-266
- Tou Shii Ch, MA SS, Ching H (1992) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in suspensions cell cultures of triploid bananas (*Musa*, AAA subgroup cavendish). En: Abstract of international symposium on recent development in banana cultivation technology. V meeting of international group on horticultural physiology of banan. Pingtung, Taiwan. pp. 21-22.