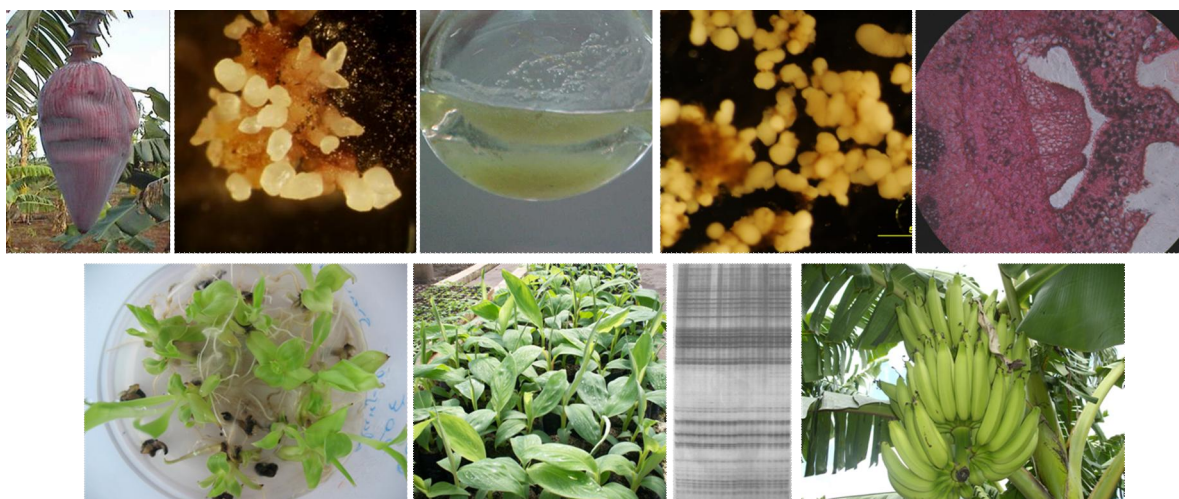


 UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRISLISTOGA. 1948
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS 

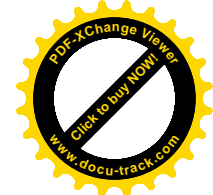
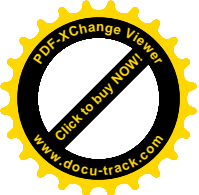
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DEL CV. HÍBRIDO DE PLÁTANO 'FHIA-21' (*MUSA AAAB*) EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS



TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

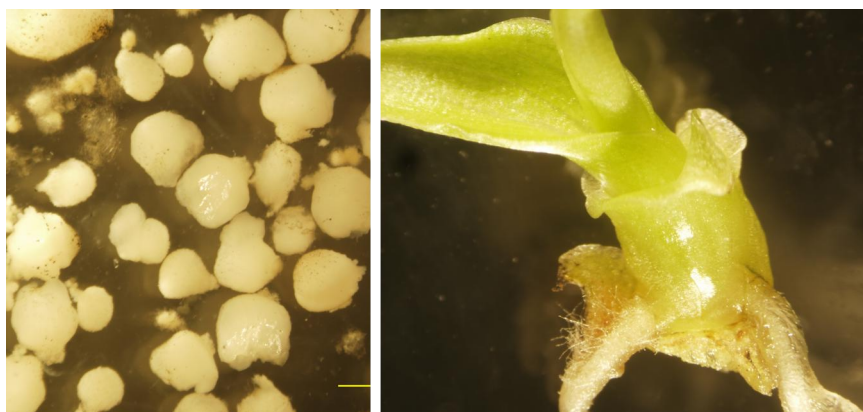
ASPIRANTE: MSc. LEYANES GARCÍA ÁGUILA

Santa Clara, Cuba
2011



 UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRISLISTOGA. 1948
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS 

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DEL CV. HIBRIDO DE PLÁTANO 'FHIA-21' (*MUSA AAAB*) EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS



TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

Aspirante: MSc. Leyanes García Águila

Tutor: Dr.C. Rafael Gómez Kosky

Santa Clara, Cuba
2011

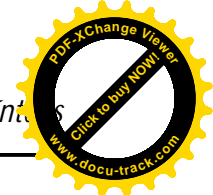
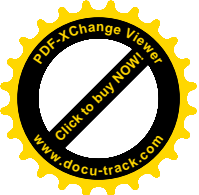
Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

1. García- Águila, L. Embriogénesis somática del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) en medios de cultivo líquidos [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, 2011. 101 p.

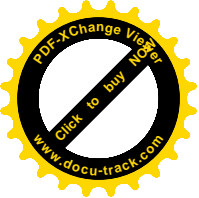
Según Sistema de Referencia Apellido, año

García- Águila, L. 2011. Embriogénesis somática del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) en medios de cultivo líquidos [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 101 p.

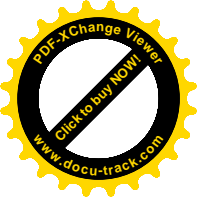


SÍNTESIS

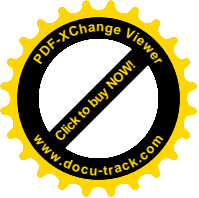
A pesar de los avances que tiene la embriogénesis somática de *Musa* spp. no es suficiente el conocimiento científico para su empleo en la propagación *in vitro* del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB). Es por ello, que esta investigación tuvo como objetivos: seleccionar el explante inicial para la formación de callos con estructuras embriogénicas y el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas; determinar el efecto de la densidad de inoculación sobre la formación y maduración de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido; así como caracterizar morfológica, agronómica y molecularmente las plantas en campo. Los resultados demostraron que la selección del explante inicial es un factor determinante en la inducción de la embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras. La mayor formación de callos con estructuras embriogénicas se logró (8,77%) cuando el brote floral masculino se encontraba después de emitida la última flor femenina. Además, se precisó que callos con estructuras embriogénicas compuestas por masas de proembriones y embriones somáticos en etapas tempranas de desarrollo ontogénico proporcionaron un 85,0% de suspensiones celulares embriogénicas. Adicionalmente, se corroboró a través del estudio morfológico e histológico la importancia de la densidad de inoculación sobre la formación y maduración de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido. Este factor influyó sobre el número de embriones somáticos, su morfología y sincronización de los cultivos embriogénicos en estas fases. El mayor número de embriones somáticos con desarrollo homogéneo (etapa globular) se obtuvo con 1,5 gMF/30mL de densidad de inoculación. En la fase de maduración, la densidad de inoculación de 0,6 gMF/30mL contribuyó a una mayor sincronización en el desarrollo morfológico de los embriones somáticos, con evidencias histológicas de los meristemas caulinar y radicular. Lo anterior proporcionó un incremento de la germinación y regeneración de plantas completas. Por su parte, las evaluaciones en campo mostraron una mejor respuesta morfológica y agronómica en plantas provenientes del cultivo *in vitro*, con respecto a las plantas originadas de semilla asexual. Los resultados con los marcadores AFLP no indicaron variaciones genéticas entre y dentro de las tres poblaciones de plantas del cv. 'FHIA-21' obtenidas por embriogénesis somática, organogénesis y semilla asexual. Estos resultados permitieron elaborar un protocolo de embriogénesis somática para la propagación *in vitro* de este cultivar utilizando medios de cultivo líquido.



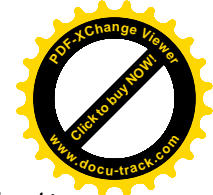
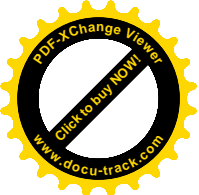
ÍNDICE	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Características generales del género <i>Musa</i>	5
2.1.1 Origen, descripción botánica y taxonómica.....	5
2.1.2 Importancia y situación en Cuba.....	7
2.1.3 Métodos de propagación.....	8
2.2 Regeneración de plantas por embriogénesis somática	10
2.2.1 Aspectos generales.....	10
2.2.2 Fases de la embriogénesis somática.....	11
2.2.2.1 Inducción de los cultivos embriogénicos.....	11
<i>Origen de los callos y sus tipos</i>	12
<i>Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas</i> ..	13
2.2.2.2 Formación y multiplicación de embriones somáticos.....	14
2.2.2.3 Maduración de los embriones somáticos.....	14
2.2.2.4 Germinación de los embriones y conversión en plantas.....	15
2.2.3 Factores que inciden en la regeneración de plantas por embriogénesis somática.....	16
2.2.3.1 Influencia del explante inicial.....	16
2.2.3.2 El medio de cultivo.....	17
<i>Reguladores del crecimiento</i>	17
<i>Elementos minerales y estado físico del medio de cultivo</i>	18
2.2.3.3 Densidad de inoculación.....	20
2.2.4 Embriogénesis somática en <i>Musa</i>	21
2.3 Estabilidad genética de plantas de <i>Musa</i> procedentes del cultivo <i>in vitro</i>	26
2.2.1 Caracterización morfológica y agronómica.....	26
2.3.2 Marcadores moleculares del ADN.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
<i>Procedimientos generales</i>	28
<i>Material Vegetal</i>	29
3.1 Selección del explante inicial para la formación de callos con	



estructuras embriogénicas y establecimiento de suspensiones celulares.....	32
3.1.1 Formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de flores masculinas inmaduras.....	32
3.1.2 Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de callos con estructuras embriogénicas.....	34
3.2 Efecto de la densidad de inoculación sobre la formación y maduración de embriones somáticos en medio de cultivo líquido.....	36
3.2.1 Formación de embriones somáticos.....	36
3.2.1.1 Morfología e histología de los embriones somáticos.....	37
3.2.1.2 Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo	38
3.2.2 Maduración de embriones somáticos.....	38
3.2.2.1 Morfología e histología de los embriones somáticos.....	39
3.2.2.2 Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo	40
3.2.2.3 Efecto de la densidad de inoculación sobre la germinación de los embriones somáticos.....	40
3.3 Caracterización morfológica, agronómica y molecular de plantas regeneradas por embriogénesis somática.....	42
3.3.1 Evaluación en casa de cultivo de plantas obtenidas por cultivo <i>in vitro</i>	42
3.3.2 Evaluación en campo de caracteres morfológicos y agronómicos de las plantas.....	43
3.3.3 Análisis molecular de la estabilidad genética de las plantas.....	44
<i>Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico.....</i>	<i>45</i>
<i>Reacción de AFLP.....</i>	<i>45</i>
4. RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	47
4.1 Selección del explante inicial para la formación de callos con estructuras embriogénicas y establecimiento de suspensiones celulares.....	47
4.1.1 Formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de flores masculinas inmaduras.....	47
4.1.2 Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de callos con estructuras embriogénicas.....	54



4.2 Efecto de la densidad de inoculación sobre la formación y maduración de embriones somáticos en medio de cultivo líquido.....	59
4.2.1 Formación de embriones somáticos.....	59
4.2.1.1 Morfología e histología de los embriones somáticos.....	60
4.2.1.2 Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo	65
4.2.2 Maduración de embriones somáticos.....	71
4.2.2.1 Morfología e histología de los embriones somáticos.....	71
4.2.2.2 Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo	75
4.2.2.3 Efecto de la densidad de inoculación sobre la germinación de los embriones somáticos.....	77
4.3 Caracterización morfológica, agronómica y molecular de plantas regeneradas por embriogénesis somática.....	83
4.3.1 Evaluación en casa de cultivo de plantas obtenidas por cultivo <i>in vitro</i>	83
4.3.2 Evaluación en campo de caracteres morfológicos y agronómicos de las plantas.....	87
4.3.3 Análisis molecular de la estabilidad genética de las plantas.....	94
5. CONCLUSIONES.....	99
6. RECOMENDACIONES.....	101
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

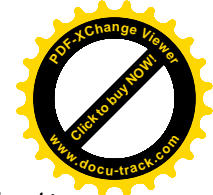
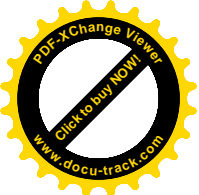


1. INTRODUCCION

Los plátanos y bananos (*Musa spp.*) se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo y son un componente importante en la alimentación de millones de personas. La producción mundial de musáceas fue de 133 390 319 toneladas métricas en el año 2010 y de ellas, el 26,99% correspondieron a cultivares de plátano vianda (FAOSTAT, 2011).

En Cuba se dedican grandes extensiones de tierra a la producción de diferentes cultivares de plátanos y bananos híbridos obtenidos por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) (Orellana *et al.*, 2002). Uno de ellos, el 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), ha despertado el interés de los productores nacionales como una alternativa para la producción de plátano vianda (Bermúdez-Carabaloso *et al.*, 2010). Sin embargo, la poca disponibilidad de material vegetal certificado para ser utilizado como semilla, ha limitado que se extienda rápidamente por todo el país. Una posible solución a este problema está en las potencialidades que brinda el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

En Cuba, la propagación *in vitro* a escala comercial, a través del cultivo de ápices meristemáticos (organogénesis), se ha convertido en una metodología de rutina para determinados genotipos de plátanos y bananos (De Feria *et al.*, 2005). Sin embargo, en el caso del cv. 'FHIA-21' su empleo se ha limitado por la escasa formación de brotes axilares y por consiguiente el bajo coeficiente de multiplicación. La necesidad de producir material vegetal de plantación de alta calidad ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos de propagación *in vitro*. El cultivo en inmersión temporal ha contribuido, a corto plazo, a la propagación *in vitro* de este cultivar (De Feria *et al.*, 2005; Basail *et al.*, 2007), mientras, que a largo plazo se venzan obstáculos biológicos que permitan la obtención eficiente de plantas por embriones somáticos en biorreactores (Escalona *et al.*, 1999, Escalona *et al.*, 2003). Esta tecnología requiere del empleo de medios de cultivo líquido, lo cual abre la posibilidades a la automatización (Ettienne y Berthouly, 2002).

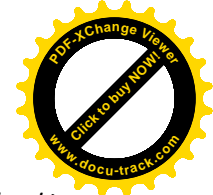
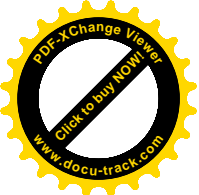


La embriogénesis somática es un proceso de regeneración de plantas que ha sido descrito para especies vegetales dicotiledóneas y monocotiledóneas. Este ofrece la posibilidad de formación y multiplicación ilimitada de embriones somáticos con capacidad de germinación y regeneración de plantas completas (Ibaraki y Kurata, 2001).

La embriogénesis somática, en el género *Musa*, se ha empleado fundamentalmente como herramienta en programas de mejoramiento genético (Daniels *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2010). No obstante, Côte *et al.* (2000) y Kosky *et al.* (2002) refieren de su posible uso para la propagación *in vitro* de plantas de cultivares de plátanos y bananos.

La embriogénesis somática en este cultivo se ha desarrollado a partir de diferentes órganos y tejidos de la planta; pero los explantes iniciales más utilizados para la iniciación del proceso son las flores masculinas y femeninas inmaduras (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 2000; Kosky *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2010). Aunque, la baja formación de callos con estructuras embriogénicas sigue siendo uno de los principales obstáculos para la iniciación del proceso embriogénico porque limita significativamente el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas (Daniels *et al.*, 2002; Jalil., *et al* 2003; Strosse *et al.*, 2006). Los estudios relacionados con la selección del explante inicial podrían contribuir a incrementar la formación de callos con estructuras embriogénicas, teniendo en cuenta que la inducción de la respuesta embriogénica guarda una estrecha relación con el estado fisiológico de una planta donadora de explantes (Fehér, 2008). Lo anterior no ha sido estudiado durante la inducción de la respuesta embriogénica en el género *Musa* spp.

Adicionalmente, los cultivos embriogénicos se caracterizan por una alta heterogeneidad dado por la presencia de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo ontogénico (Celestino *et al.*, 2005). Este aspecto se considera la principal desventaja del método para su uso en la propagación comercial y se agudiza en *Musa* spp. por la difícil identificación de las etapas de desarrollo del embrión somático (Jalil *et al.*, 2008).



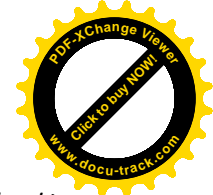
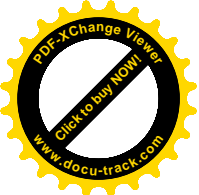
Según Kosky *et al.* (2002) la formación de embriones somáticos del cv. 'FHIA-18' (*Musa* AAAB) en medios de cultivo líquido contribuyó a la reducción de la asincronía durante su germinación. Además, Cabrera *et al.* (2002) y Barranco *et al.* (2009) consideraron la densidad de inoculación como un factor importante en la formación y maduración de embriones somáticos de 'Navolean' (*Musa* ABB) y 'FHIA-18' (*Musa* AAAB), respectivamente, en medio de cultivo líquido. Los estudios relacionados con estos aspectos en el cv. 'FHIA 21', unido a la caracterización morfológica e histológica de los embriones podría contribuir a identificar las etapas de desarrollo y a determinar las condiciones de cultivo que favorezcan la sincronización de los cultivos embriogénicos en este cultivar.

Por otra parte, el bajo número de plantas evaluadas en campo limita el empleo comercial de la embriogénesis somática como tecnología para la propagación *in vitro*. Estos estudios se han efectuado en cultivares de bananos (Côte *et al.*, 2000; Kosky *et al.*, 2006), con excepción de López *et al.* (2005) en el cultivar 'Navolean' (*Musa* ABB). En este sentido, un aspecto importante lo constituye la determinación de la estabilidad genética de las plantas a través de la combinación de marcadores morfológicos, agronómicos y moleculares.

En el cv. de plátano 'FHIA-21' se desarrolló un protocolo de embriogénesis somática en medio de cultivo semisólido, como método de regeneración de plantas para el mejoramiento genético mediante la transformación genética (Daniels *et al.*, 2002). A pesar de ello, no es suficiente el conocimiento científico para su empleo en la propagación *in vitro* de este cultivar. Se requiere del establecimiento del proceso en medios de cultivo líquido para aumentar su eficiencia y de la evaluación de las plantas en condiciones *ex vitro*.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

“Con la selección del explante inicial, la determinación de la densidad de inoculación en medio de cultivo líquido y la evaluación morfológica, agronómica y molecular de las



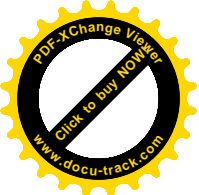
plantas se podría utilizar la embriogénesis somática para la propagación *in vitro* del cv. de plátano 'FHIA-21' (Musa AAAB)".

Para dar cumplimiento a la hipótesis planteada, se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar el explante inicial para la formación de callos con estructuras embriogénicas y el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas.
2. Determinar el efecto de la densidad de inoculación sobre la formación y maduración de embriones somáticos en medio de cultivo líquido.
3. Caracterizar morfológica, agronómica y molecularmente las plantas regeneradas por embriogénesis somática.

Novedad científica: Por primera vez se logró un protocolo de embriogénesis somática para la propagación *in vitro* del cv. de plátano 'FHIA-21' (AAAB) utilizando medios de cultivo líquido. A partir de este se obtuvieron plantas genéticamente estables evaluadas mediante la combinación de caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares (AFLP), resultados no descritos con anterioridad en la literatura internacional para este género.

Importancia práctica: Se logró la propagación *in vitro* del cv. 'FHIA-21' por embriogénesis somática utilizando medios de cultivo líquido, con el incremento del número de callos con estructuras embriogénicas y establecimiento de suspensiones de células embriogénicas. Adicionalmente, se definió la densidad de inoculación para la sincronización de los cultivos embriogénicos, lo cual permitió una mayor eficacia en la propagación *in vitro* de este cultivar. Estos resultados pueden constituir una tecnología a utilizar en los laboratorios comerciales de cultivo de tejidos en Cuba (Biofábricas) y en el extranjero.



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características generales del género *Musa*

2.1.1 Origen, descripción botánica y taxonómica

El género *Musa* se originó en Asia, específicamente en la península Malaya. Los cruzamientos entre *Musa balbisiana* y *acuminata* dieron origen a todas las variedades comestibles conocidas en América (Belalcázar, 1991). Respecto a su introducción en América, el cronista Oviedo sostiene que el plátano fue llevado desde La Gran Canaria a Santo Domingo por Fray Tomás de Berlanga, obispo de Panamá en 1516, de donde se propagó a otras Islas del Caribe entre ellas Cuba y posteriormente al continente (López, 1989).

La familia de las musáceas pertenece al orden *Zingiberales*. Dentro de la misma existen dos géneros: *Musa* y *Ensete*. El género *Musa* se divide en cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhadochlamys* y *Eumusa*. Está última sección comprende a las especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. Las musáceas comestibles se dividen en dos tipos: plátanos y bananos.

Los plátanos y bananos son plantas herbáceas perennes que pueden alcanzar seis metros de altura. El pseudotallo está formado por las vainas de las hojas superpuestas, un cormo y un sistema radicular fibroso. Las nuevas hojas surgen en un estado de arrollamiento sumamente apretado en forma de cigarro.

La inflorescencia se forma a partir del meristemo terminal como resultado de la diferenciación de los primordios foliares en florales y experimenta un desarrollo considerable en el interior del pseudotallo antes de brotar del mismo (Berrie, 1997). Desde la diferenciación hasta que emerge la inflorescencia en el ápice de la planta, ésta experimenta un aumento considerable de su tamaño con un promedio de 60,0 cm de longitud y 35,0 cm de perímetro en la zona de mayor espesor (Nalina *et al.*, 2006). Esta

puede ascender desde la base del pseudotallo hasta el tope de la planta en un mes, con una velocidad media de ocho centímetros diarios (López, 1989). En la figura 1 se muestra un esquema con la apariencia general de la planta de *Musa* spp.

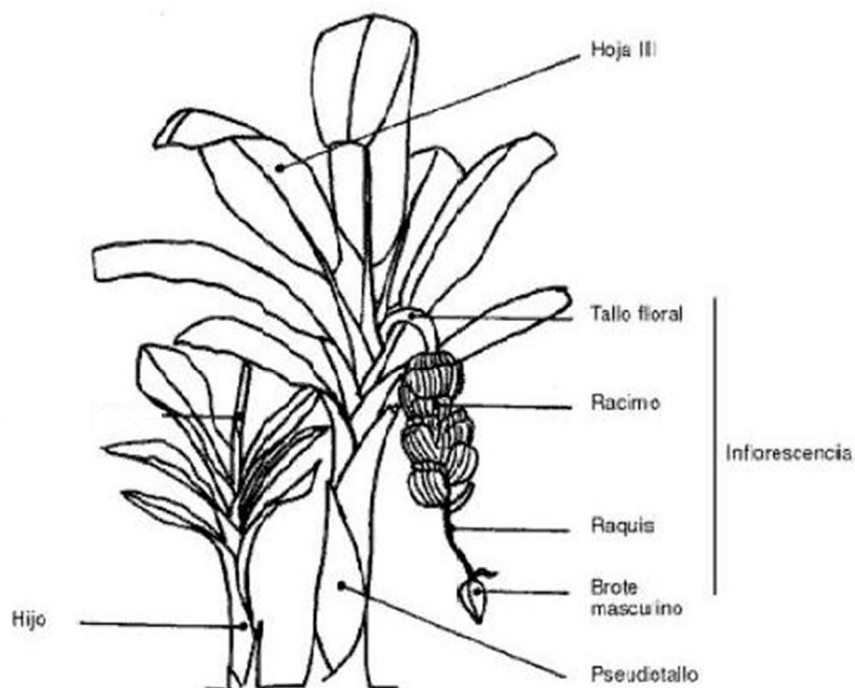
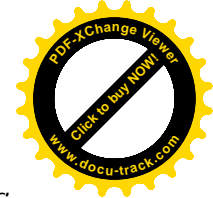
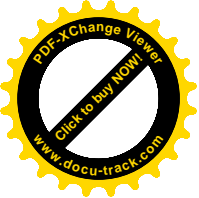


Figura 1. Apariencia general de la planta de *Musa* spp. (Tomado de IPGRI-INIBAP/CIRAD, 1996).

La inflorescencia está conformada de afuera hacia adentro por las brácteas, las cuales en forma alterna cubren seis o siete grupos de flores femeninas y un número variable de flores masculinas. Las flores femeninas son las primeras en diferenciarse, transformándose los ovarios en los frutos partenocárpicos y el crecimiento continúa (punto vegetativo del brote masculino) levantándose las brácteas para dejar expuestas las flores masculinas a medida que sigue aumentando la longitud del eje. Las flores masculinas desarrollan los estambres y su ovario permanece reducido (Balalcázar, 1991). Según López (1989), la longitud del brote floral masculino (pámpana) disminuye desde su



aparición hasta la cosecha en la medida que aumenta el crecimiento del tallo floral o eje de la inflorescencia (Tabla 1).

Tabla 1. Crecimiento del eje de la inflorescencia y del brote floral masculino (cm) desde su aparición hasta la cosecha (López, 1989).

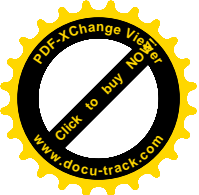
Días	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Longitud del eje de la inflorescencia	7,6	39,9	75,1	88,9	93,5	106,5	108,1	117,8	121,6	127,6	132,4	140,8
Longitud del brote masculino	---	---	29,0	24,0	22,5	21,0	19,8	18,0	16,8	18,8	14,8	13,5

La mayoría de los plátanos y bananos son estériles pero las especies silvestres tienen frutos con semillas que se desarrollan únicamente si son polinizados de manera efectiva (Soto, 1985). El número básico de cromosomas en el género *Musa* (Sección *Eumusa*) fue determinado en la década de los treinta y los cuarenta del siglo XX (Sandoval y Escoute, 1996). Los resultados de estos estudios indicaron que el número básico es de 11 cromosomas y existen tres niveles principales de ploidía natural en el género: diploide $2n=2x=22$, tríploide $2n=3x=33$ y tetraploide $2n=4x=44$.

2.1.2 Importancia y situación en Cuba

Los plátanos y bananos son ampliamente utilizados en la nutrición de la población y se consideran fuente de vitaminas A, B₁, B₂, B₆ y C (MUSADOC, 2000). En el mercado internacional representan las primeras frutas de exportación y ocupan el segundo lugar, en términos de valor, después de los cítricos. Del volumen total de frutas producidas en el mundo, este cultivo constituyen el 12,0% (Espinal *et al.*, 2006).

En Cuba es elevado el consumo de plátanos y bananos por sus habitantes y estos forman parte esencial de su dieta alimenticia. Sin embargo, la producción de las empresas estatales, así como la de pequeños productores se afectó severamente por la entrada, en



noviembre de 1990, del hongo causante de la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) (Pérez y Orellana, 1994). Esto trajo como consecuencia la búsqueda de clones resistentes a la enfermedad y el empleo del cultivo *in vitro* para su rápida propagación e introducción en las áreas productivas del país.

A partir de 1988 se inició una nueva fase de desarrollo en el cultivo de bananos y plátanos, por el empleo de plantas propagadas *in vitro*, las cuales reemplazaron los clones susceptibles por híbridos resistentes a la Sigatoka negra obtenidos por la Federación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) (Pérez y Orellana, 1994). Dentro de estos se encontraban los cultivares de bananos 'FHIA-03', 'FHIA-18', 'FHIA-23' y los plátanos 'FHIA-19', 'FHIA-20' y 'FHIA-21' (FHIA, 2007).

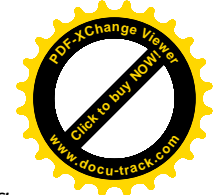
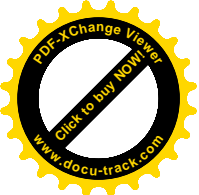
El cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) adquirió rápidamente popularidad y aceptación por presentar buenas características agronómicas y organolépticas (Orellana *et al.*, 1999). Es por ello, que su producción se ha extendido e incrementado en la mayoría de los países de América Latina (Álvarez y Rosales, 2008).

En ficha técnica del cultivar 'FHIA-21' presentada FHIA por la (2002) se describen sus características morfológicas y agronómicas (Anexo 1).

Álvarez y Rosales (2008) también determinaron los principales caracteres morfológicos para la identificación de los cultivares híbridos de bananos y plátanos de la FHIA en Cuba. Entre los más distintivos encontraron la coloración del pseudotallo, disposiciones de las hojas y el tipo y color del canal peciolar. En el caso del cultivar 'FHIA-21', las plantas se caracterizan por presentar un pseudotallo verde claro con manchas oscuras en la inserción de los pecíolos, hojas decumbente y pecíolos curvados hacia adentro con márgenes de color rosado a rojo.

2.1.3 Métodos de propagación

La propagación de las musáceas obedece sólo a métodos asexuales. Por lo tanto, las "semillas" utilizadas para la siembra corresponden a partes vegetativas de la planta:



retoños, cormos o hijos que una vez separados de la planta madre, pueden realizar su ciclo de crecimiento y producción (Martínez *et al.*, 2004).

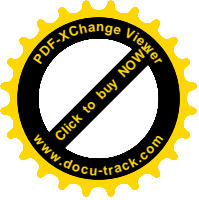
La selección del material de propagación es el primer paso para iniciar la siembra comercial del cultivo. Los hijuelos con 50 a 100 cm de longitud son los más utilizados, los cuales tienen su origen en la zona interna del corno y emergen a la superficie por la base del entrenudo. Sin embargo, con este material de propagación existe una alta probabilidad de diseminación de plagas y enfermedades dentro de las plantaciones. Entre las cuales se pueden mencionar el complejo de nemátodos (*Radopholus similis*, *Helycotlenchus*, *Pratylenchus* spp.), el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), los hongos *Marasmiellus troyanus* y *Fusarium oxysporum* sp. *Cubense*, las bacterias *Erwinia caratovora* y *Pseudomonas solanacearum* y los virus del mosaico del pepino (CMV, del inglés: *Cucumber Mosaic Virus*) y estriado del banano (BSV, del inglés: *Banana Streak Virus*) (Sandoval *et al.*, 1991).

De igual forma, cabe destacar que estos hijuelos presentan tamaños y edades variables, que originan plantas con diferente vigor, ocasionando diferencias marcadas en la época de maduración y cosecha de los racimos.

La disponibilidad de un material vegetal de plantación en óptimas condiciones fitosanitarias y que permita realizar labores de cosecha de manera más eficiente, solo ha sido posible a través del uso de plantas procedentes del cultivo *in vitro* (Martínez *et al.*, 2004).

Desde hace cuatro décadas se emplean las técnicas de cultivo *in vitro* para el saneamiento y propagación de musáceas. La micropropagación de plátanos y bananos forma parte de la modernización de la agricultura en muchos países y ha contribuido a mejorar las condiciones sanitarias de las plantaciones e incrementar su productividad (Castro *et al.*, 2002).

La regeneración de plantas mediante el cultivo de ápices meristemáticos (organogénesis) es el método más utilizado para la propagación comercial de *Musa* spp. El primer trabajo



fue informado por Ma y Shii en el año 1972 y a partir de este se ha descrito en la literatura científica la regeneración de plantas en diferentes cultivares de plátanos y bananos. Su aplicación comercial se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, la calidad de los explantes y alto costo asociado a la mano de obra en las fases de multiplicación y enraizamiento (Castro *et al.*, 2002; Escalona *et al.*, 2003; Feria *et al.*, 2005a; Basail *et al.*, 2007).

En el cultivar de plátano 'FHIA-21', la propagación *in vitro* a través del cultivo de ápices ha mostrado baja tasa de multiplicación y la presencia de brotes deformados con crecimiento en rosetas. Con el objetivo de solucionar esta problemática Jiménez-Terry *et al.* (2002) adicionaron brasinoesteroide (BIOBRAS-6) al medio de cultivo durante la fase de multiplicación. Posteriormente, de Feria *et al.* (2005a) y Basail *et al.* (2007) propusieron la automatización de esta fase con el empleo de medio de cultivo líquido en sistemas de inmersión temporal (SIT). En estos estudios se logró incrementar el número de brotes por planta; pero la tasa de multiplicación no ha permitido la propagación eficiente de este cultivar.

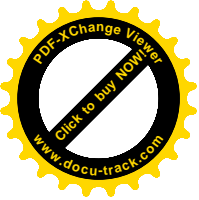
Según Ibaraki y Murata (2001) la embriogénesis somática tiene poderosas ventajas para la propagación *in vitro* de plantas debido al elevado coeficiente de multiplicación de los embriones somáticos, su uso podría ser una alternativa para solucionar la propagación de plantas del cv. de plátano 'FHIA-21'.

2.2 Regeneración de plantas por embriogénesis somática

2.2.1 Aspectos generales

La embriogénesis somática es una reestructuración en el desarrollo de células somáticas hacia el camino embriogénico, sobre la base de la totipotencia celular de las plantas superiores (Imin *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2006).

Durante este proceso, las células somáticas pasan por diferentes estados embriogénicos siguiendo un patrón de desarrollo idéntico al del embrión cigótico; pero sin la fusión de



gametos (von Arnold, 2008). Según Karami y Saidi (2010), la considerable semejanza entre la embriogénesis somática y la cigótica se debe a la conservación de los mecanismos celulares y moleculares que lo sustentan.

En el cultivo *in vitro*, los primeros hallazgos de embriogénesis somática fueron observados en suspensiones celulares de zanahoria (*Daucus carota* L.) por Steward *et al.* (1958) y Reinert (1958) y posteriormente se han descrito en otras especies de plantas.

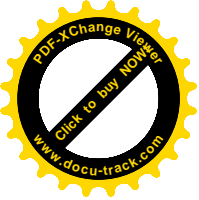
Los embriones somáticos son estructuras bipolares (ápice radical–apical) que no poseen conexión vascular con el tejido materno (Litz y Jarret, 1991) y presentan autonomía frente al tejido generador (Escalant y Teisson, 1989). Están protegidos generalmente por una epidermis, presentan bandas procambiales entre los ápices y son capaces de crecer y formar plantas normales (von Arnold *et al.*, 2002). Además, como la célula o grupo de células iniciales que le dieron origen no son producto de un proceso de recombinación y fusión de gametos, se conserva íntegramente el genotipo de la planta donante (von Arnold, 2008).

2.2.2 Fases de la embriogénesis somática

2.2.2.1 Inducción de los cultivos embriogénicos

La inducción de la embriogénesis somática está restringida a determinadas células del tejido del explante (Gaj 2004; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006), las cuales presentan potencial para activar los genes implicados en la generación de células embriogénicas (Chung y Khurana, 2002; Zeng *et al.*, 2007). Los agentes más usados para la inducción pueden variar desde diversos tipos de reguladores del crecimiento hasta diferentes tratamientos de estrés (Fehér *et al.*, 2003, Fehér, 2005). Estas células frente a estímulos físico-químicos sustituyen su patrón de expresión génica por un programa de expresión de genes embriogénicos (von Arnold, 2008; Zavattieri *et al.*, 2010).

Según Fehér (2008), la adquisición de competencia embriogénica de las células somáticas de la planta depende de muchas circunstancias, sobre todo esta determinado



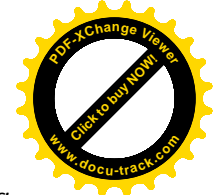
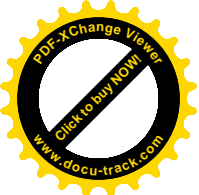
por el estado fisiológico de la célula fijado por sus condiciones genéticas y de desarrollo. Esta complicada interacción de factores genéticos y fisiológicos explica porqué sólo algunos genotipos y ciertas células pueden ir a través de todo el proceso de embriogénesis somática.

Al respecto, se reconoce como embriogénesis somática directa cuando se forman los embriones somáticos directamente de los tejidos del explante inicial e indirecta cuando se desarrolla un callo previo a la formación de los embriones somáticos (Aly *et al.*, 2002; von Arnold *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003, von Arnold, 2008).

Origen de los callos y sus tipos

Las células somáticas especializadas sufren una dediferenciación que origina la formación de callos con células totipotentes, capaces de regenerar plantas enteras, ya sea a través de la organogénesis o embriogénesis somática (Evans *et al.*, 2003). Este proceso de dediferenciación es caracterizado por cambios en la actividad metabólica, la disminución de productos de reserva y la rápida división celular (Fehér, 2005).

Las características morfológicas del callo dependen del tejido madre o explante inicial, de las condiciones de crecimiento, así como la edad de cultivo (Vasil, 1988). El callo puede variar en sus características morfológicas y citológicas; puede tener una apariencia compacta, superficie nodular, color blanco amarillo pálido y cierto aspecto organizado (Evans *et al.*, 2003). Por lo general, es fácil distinguir entre callos embriogénicos y no embriogénicos basado en su morfología y color. Los callos con estructuras embriogénicas están formados por masas proembriogénicas y con frecuencia se encuentran rodeados por un callo no embriogénico (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). En otros casos se observan porciones de callos con estructuras embriogénicas distribuidos al azar en la superficie del callo no embriogénico. La parte embriogénica del callo crece de forma más lenta que el callo no embriogénico y puede ser mantenida en cultivo por largos períodos de tiempo



mediante la selección cuidadosa y el subcultivo de los sectores embriogénicos (von Arnold, 2008).

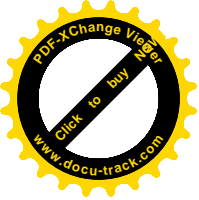
Los cultivos de callos con estructuras embriogénicas se pueden mantener e incrementar en medio de cultivo semisólido, en condiciones similares a las utilizadas para su inducción. Sin embargo, la tasa de multiplicación de las células embriogénicas es mayor en medio de cultivo líquido (von Arnold, 2008).

Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas

El desarrollo de suspensiones de células embriogénicas a partir de callos se logra transfiriendo porciones de callos con estructuras embriogénicas en etapa globular, en medio de cultivo líquido (Kosky, 1998). De esta manera se inicia la fase de establecimiento de la suspensión celular, posteriormente se multiplican para lograr a partir de ellas embriones somáticos durante el proceso de diferenciación de los agregados celulares (Kobayashi *et al.*, 2001; Strosse *et al.*, 2003; Fereol *et al.*, 2005, von Arnold, 2008).

Una suspensión celular embriogénica queda establecida después de un período de adaptación al medio de cultivo líquido. Estas se caracterizan por presentar un predominio de agregados celulares embriogénicos, los cuales presentan células embriogénicas esféricas, con contenido citoplasmático denso, vacuolas pequeñas, gránulos de almidón y una alta relación núcleo-citoplasma (De Vries *et al.*, 1988; Grapin *et al.*, 1996; Georget *et al.*, 2000).

Los cultivos en suspensión se desarrollan como estructuras separadas de células embriogénicas individuales o agregadas, lo cual facilita la sincronización por tamizado antes de ser transferidas a un medio de cultivo para estimular la formación del embrión somático (von Arnold, 2008).



2.2.2.2 Formación y multiplicación de embriones somáticos

Para inducir la formación de los embriones somáticos a partir del cultivo de células embriogénicas es necesario reducir en el medio de cultivo la concentración de auxina (De Vries *et al.*, 1988; Filonova *et al.*, 2000).

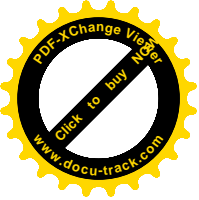
El grado de diferenciación de los embriones somáticos varía en las distintas especies de plantas. Sin embargo, en muchas especies a partir del embrión primario no se desarrolla una planta sino que da lugar a sucesivos ciclos de embriones secundarios, terciarios, etc, lo cual se reconoce como embriogénesis secundaria, continua o recurrente. En algunos casos la formación de embriones secundarios es de gran importancia para aumentar la cantidad de plantas regeneradas (Merkle *et al.*, 1995; von Arnold, 2008).

Según von Arnold (2008), existe una fase de premaduración que separa la fase inducción de los cultivos embriogénicos (masas proembriogénicas) de la fase de formación del embrión somático. Estos autores consideran que la incapacidad de muchas líneas de células embriogénicas para formar embriones somáticos bien desarrollados está en gran medida asociada con trastornos durante transición de proembriones a embriones somáticos. Adicionalmente, señalan que hasta que los embriones no lleguen a una fase apropiada del desarrollo no deben ser expuestos a tratamientos de maduración.

2.2.2.3 Maduración de los embriones somáticos

Durante la fase de maduración los embriones somáticos sufren cambios morfológicos y bioquímicos. En tanto, se desarrollan se presenta la expansión de las células, con la acumulación de sustancias de reserva y la adquisición de tolerancia a la desecación (Parrot, 1993; Merkle *et al.*, 1995; Jiménez, 2001).

Las sustancias de reserva que se acumulan en los embriones somáticos presentan las mismas características que las almacenadas en los embriones cigóticos y también se depositan en compartimentos subcelulares (Merkele *et al.*, 1995). Sin embargo, la



cantidad de un producto de almacenamiento en particular, así como el momento de su acumulación puede ser diferente entre los embriones somáticos y cigóticos (Merkel *et al.* 1995; Yeung, 1995).

Por otra parte, al igual que los embriones cigóticos, la maduración del embrión somático termina en un cierto grado de secado, que se traduce en una reducción gradual del metabolismo por la pérdida de agua, pasando a un estado metabólicamente inactivo o de reposo (Jiménez, 2001, von Arnold, 2008).

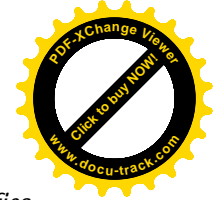
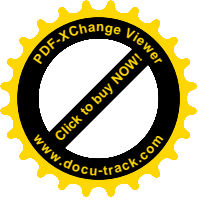
2.2.2.4 Germinación de los embriones y conversión en plantas

Es importante definir que la germinación se refiere al crecimiento del brote y la raíz de los embriones somáticos en condiciones *in vitro* (Söndahl *et al.*, 1991), mientras que la conversión fue un término descrito por Stuart y Strickland (1984), referido a la supervivencia y desarrollo de las plantas en condiciones ambientales, o sea *ex vitro*.

Varios autores, al pasar los embriones directamente de las condiciones de maduración a germinación, han alcanzado pobres resultados (Parrot *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1990; Senaratna *et al.*, 1990) y es que solo los embriones maduros con acumulación suficiente de sustancias de reserva y tolerancia a la desecación se desarrollan en plantas normales (von Arnold, 2008).

Los embriones somáticos desarrollan generalmente plantas pequeñas, comparables a las plántulas obtenidas en medio de cultivo que carecen de reguladores de crecimiento. Esto sugiere el empleo de tratamientos postmaduración, para mejorar la germinación de los embriones. La presencia de auxina y citoquinina en el medio de cultivo puede estimular su germinación (von Arnold, 2008).

Cuando las plantas han alcanzado un tamaño adecuado se pueden transferir *ex vitro*. En muchas publicaciones científicas se ha demostrado que las plantas de embriones somáticos crecen de una manera similar a las plantas procedentes de semillas sexuales. Sin embargo, es un problema la presencia de alguna variación somaclonal de las



especies. En general, el uso de 2,4-D con una fase prolongada de callos son responsables de la inducción de variación genética, así como epigenética (vonArnold, 2008).

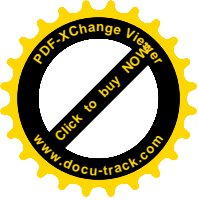
En consecuencia, el crecimiento *ex vitro* de las plantas procedentes de embriones somáticos es el resultado de los tratamientos previos realizados durante las fases *in vitro* (Högberg *et al.*, 2001; von Arnold *et al.*, 2002; Gaj, 2004). Sin embargo, la inducción de los embriones somáticos y la regeneración de plantas todavía no son procesos eficientes para muchas especies de plantas.

2.2.3 Factores que inciden en la regeneración de plantas por embriogénesis somática

2.2.3.1 Influencia del explante inicial

La respuesta embriogénica está epigenéticamente determinada e influenciada por la etapa de desarrollo de la planta donadora u órganos que se utilizan como fuente de explante (Fehér, 2008). Esta se ha inducido sobre diferentes tipos de explantes: fragmentos de plantas, flores, pecíolos, hojas, meristemos, raíces, y embriones cigóticos (Gahan y George, 2008).

Los diferentes tipos de explantes utilizados para inducir la embriogénesis somática muestran la mayor respuesta a una determinada edad (Gaj, 2004). El nivel de fitohormonas endógenas es considerado como uno de los factores cruciales que influyen en potencial embriogénico de los explantes (Thomas *et al.* 2002). La cantidad y la calidad de las hormonas endógenas (auxinas, citoquininas y ABA) se encontró que era desigual entre explantes que muestra diferentes potenciales embriogénicos. Sin embargo, dentro de un explante sus diferentes regiones pueden variar en su actividad morfogénica, es decir sólo ciertas células o tejidos del explante participaron en la respuesta embriogénica mostrando sensibilidad a las condiciones de cultivos durante la fase de inducción (Gaj, 2004; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).



Según Merkle *et al.* (1995), el tipo de célula que forma el tejido del explante determina el tipo de embriogénesis somática: células somáticas determinadas preembriogénicamente (CsDPE) o células somáticas no embriogénicas (CsNE). En el primer caso (CsDPE), un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de embriones somáticos a partir del tejido del explante y producirse la embriogénesis somática directa, donde las células del explante primario son la fuente de los embriones somáticos. Cuando las células somáticas presentes no son embriogénicas, éstas deben sufrir varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina para la formación de un callo embriogénico (masas de proembriones), ocurriendo una embriogénesis indirecta.

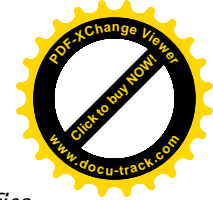
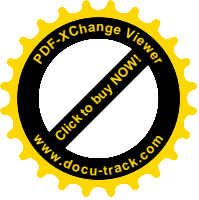
La selección del explante inicial debe estar centrada en la búsqueda de tejidos de la planta donante que contengan células competentes, capaces de responder ante factores externos y en consecuencia experimentar respuesta embriogénica (Gaj 2004, Fehér, 2005). Según Pasternak *et al.* (2002), estas células presentan características específicas tales como: una activación temprana del ciclo de división celular, pH vacuolar alcalino, una alteración en el metabolismo de la auxina y cloroplastos no funcionales.

2.2.3.2 El medio de cultivo

La composición del medio de cultivo para el crecimiento *in vitro* de tejidos vegetales varía con la especie y es específica de acuerdo con la parte de la planta que se quiera cultivar o a la respuesta morfogénica que se desee obtener (Ramage y Williams, 2002). Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* (Heller, 1953; Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, 1970; Schenk y Hildebrandt, 1972). Estos medios de cultivo varían fundamentalmente en el contenido de reguladores de crecimiento, elementos minerales y estado físico.

Reguladores del crecimiento

Entre los componentes del medio de cultivo más estudiados, para la regeneración de plantas por embriogénesis somática se encuentran los reguladores del crecimiento. El



papel de las auxinas es considerado el factor más importante (Rose, 2004), el cual está relacionado con la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Fehér, 2005)), lo que conlleva a una disminución o cese de la expresión del programa genético de la célula somática para la adquisición de la capacidad embriogénica (von Arnold *et al.*, 2002; Fehér, 2008; von Arnold, 2008).

Los requerimientos de auxinas u otros reguladores de crecimiento para la el inicio de la embriogénesis somática está en gran parte determinado por la etapa de desarrollo del tejidos de los explantes (von Arnold, 2008). La auxina más utilizada es el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en una concentración de uno a diez micromolar (Raghavan *et al.*, 2006).

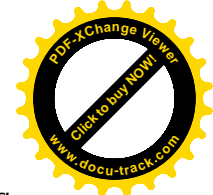
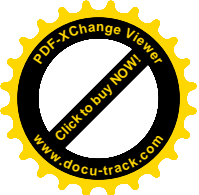
Se conoce que una reducción de las auxinas inhibe la multiplicación de las masas prombrigiénicas y estimula la formación de embriones somáticos en sus primeras etapas de desarrollo (Nomura y Komamine, 1985; De Vries *et al.*, 1988; Filonova *et al.*, 2000).

Otros aspectos del medio de cultivo como el potencial osmótico y el pH se han informado su influencia sobre la maduración de los embriones somáticos en diferentes especies. Diferentes agentes osmóticos de bajo peso molecular, como las sales inorgánicas, aminoácidos y azúcares, puede proporcionar un medio de cultivo con bajo potencial osmótico (von Arnold, 2008).

Elementos minerales y estado físico del medio de cultivo

La respuesta morfogénica de los tejidos vegetales que se cultivan *in vitro* está influenciada por la fuente extrínseca de elementos minerales en los medios de cultivo; debido a esto se han desarrollado muchas formulaciones de medios de cultivo (Ramage y Williams, 2002).

El medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) ha sido uno de los más utilizados cuando el objetivo es la regeneración de plantas. Los elementos inorgánicos de este medio son los componentes más importantes y por lo tanto son la mejor variable para



estudiar su efecto sobre potencial morfogénico de las plantas. Aunque, se conoce que puede ocurrir interacción entre elementos minerales y reguladores del crecimiento vegetal durante el período de diferenciación y crecimiento *in vitro* (Kothari-Chajer *et al.*, 2008).

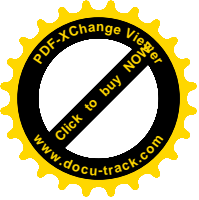
También se sabe que los niveles apropiados de elementos minerales pueden substituir parcialmente los requerimientos de reguladores del crecimiento en el medio de la regeneración de la planta (Preece, 1995; Poddar *et al.*, 1997). Según Ramage y Williams (2002), en algunos casos la proliferación de callos y la regeneración de la planta, puede ser mejorada modificando la concentración de la sales, independientemente del regulador de crecimiento usado.

El papel de las sales minerales en el desarrollo de los cultivos embriogénicos se ha estudiado en diferentes especies, tales como zanahoria (*Daucus carota* L.) (Takeda *et al.*, 2003), trigo (*Triticum aestivum* var. HD 2329) (Mahalakshmi *et al.*, 2007); melón (*Cucumis melo* L.) (Kintzios *et al.*, 2004), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*. L) (Desai *et al.*, 2006), cacao (*Theobroma cacao* L.) (Minyaka *et al.*, 2008), café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722) (De Fera *et al.*, 2009c), entre otras.

Entre los elementos minerales más importantes se encuentra el calcio porque actúa como regulador de señales estimulando la embriogénesis somática (Montoro *et al.*, 1995; Timmers *et al.*, 1996). Un incremento en la concentración de calcio y el magnesio tuvo un efecto directo en sobre la formación de mayor número de embriones somáticos de zanahoria (*Dacus carota* cv. Nants) (Ghasemi *et al.*, 2009).

Los microelementos han ganado importancia porque se observó un efecto beneficioso en la inducción del callo y la regeneración de la planta de *Paspalum scrobiculatum* y *Eleusine coracana* con el aumento en la concentración de cobre, manganeso y cobalto (Kothari-Chajer *et al.*, 2008).

El análisis del contenido residual del medio de cultivo es una herramienta importante para determinar la influencia de los elementos minerales en la respuesta de diferentes especies al cultivo de tejidos (Leifert *et al.*, 1995; Adelberg *et al.*, 2010).



Al respecto, Karami y Saidi (2010) ratificaron que los componentes nutricionales del medio de cultivo, su estado físico (líquido o semisólido), así como las condiciones de iluminación determinan la inducción de la embriogénesis somática de algunas especies de plantas. En este sentido, varios autores consideran que el cultivo en medio líquido permite el crecimiento más rápido de tejidos vegetales, con mayor rendimiento de masa fresca y seca (Etienne y Berthouly, 2002; Adelberg, 2006).

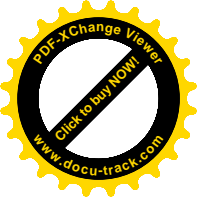
El empleo del medio de cultivo líquido aumenta la eficiencia del proceso de embriogénesis somática por la ausencia de agente gelificante y la posibilidad de automatización a escala comercial (Gupta y Timmis, 2005), además de facilitar las operaciones de renovación del medio de cultivo, la colecta de los embriones somáticos y el monitoreo de parámetros físicos (Ducos *et al.*, 2007).

En plátanos y bananos son pocos los estudios concernientes a la formación de embriones somáticos en medio de cultivo líquido. Sin embargo, su empleo podría contribuir a incrementar la eficiencia del proceso y a la sincronización de los cultivos (Kosky *et al.*, 2002).

2.2.3.3 Densidad de inoculación

La densidad de inoculación varía para cada especie y es uno de los parámetros de cultivo que define la respuesta de las suspensiones celulares embriogénicas, en muchos casos independientemente de la fase de desarrollo y la composición del medio de cultivo (Ducos *et al.*, 2007).

Diferentes autores han hecho referencia al papel de la densidad de inoculación y su relación con el proceso de diferenciación de los embriones somáticos. Estos estudios se han efectuado en especies dicotiledóneas donde las etapas de desarrollo ontogénico de los embriones somáticos están bien caracterizadas. Los primeros trabajos se realizaron en el cultivo de la zanahoria (*Daucus carota*) y evidenciaron que existe un efecto de



autoinhibición del proceso embriogénico que está ligado a las elevadas densidades de inoculación (Osuga *et al.*, 1993; Osuga y Komamine, 1994; Shigeta *et al.*, 1996).

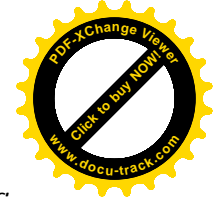
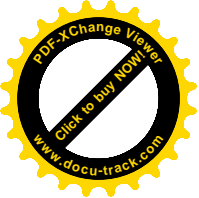
Por su parte, Barbón-Rodríguez *et al.* (2003) y De Feria *et al.* (2005b) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) señalaron que una alta densidad de inoculación proporcionó la mayor formación de embriones somáticos en etapa globular, mientras que el cultivo con baja densidad desencadenó la presencia de embriones en etapas avanzadas de desarrollo ontogénico (torpedo y cotiledonal). Según De Feria *et al.* (2009c), el efecto de la densidad de inoculación en el proceso de embriogénesis somática, puede estar relacionado, entre otras causas, con la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos en el medio de cultivo.

En *Musa*, los estudios que tratan el efecto de la densidad de inóculo en las diferentes fases de la embriogénesis somática (Cabrera *et al.*, 2002; López, 2006; Barranco *et al.*, 2009) no describen su influencia sobre el proceso de diferenciación de los embriones somáticos. Los embriones somáticos transitan rápidamente por las diferentes etapas de desarrollo ontogénico sin grandes cambios morfológicos, lo cual requiere de una caracterización morfológica e histológica para su identificación (Jalil *et al.*, 2008).

2.2.4 Embriogénesis somática en *Musa*

La regeneración de plantas por embriogénesis somática en *Musa* spp. se ha desarrollado a partir de diferentes órganos y tejidos de la planta como son:

- Ápices (Cronauer y Krikorian, 1983), tejido foliar y del rizoma cultivados *in vitro* (Novak *et al.*, 1989).
- Embriones cigóticos inmaduros (Cronauer y Krikorian, 1988; Marroquin *et al.*, 1993; Escalant y Teisson, 1998).
- Flores masculinas inmaduras (Ma, 1991; Escalant *et al.*, 1994; Côte *et al.*, 1996; Grapin *et al.*, 1996; Kosky *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 2002; Khalil *et al.*, 2002; Jalil *et al.*, 2003) y flores femeninas inmaduras (Grapin *et al.*, 2000).

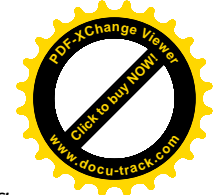
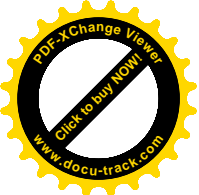


- Meristemos proliferantes (Dhed'a *et al.*, 1991; Schoofs, 1997; Strosse *et al.*, 2004)
- Domos meristemáticas de brotes axilares (López, 2006)

Estos resultados se han obtenido en diferentes condiciones de cultivo, principalmente en la composición y el estado físico del medio de cultivo.

Muchos autores han referido la iniciación de cultivos embriogénicos a partir de tejidos cultivados *in vitro*. La inducción de callos con estructuras embriogénicas a partir de ápices (Cronauer y Krikorian, 1983), tejidos foliares y del rizoma cultivados *in vitro* (Novak *et al.*, 1989), no ha podido ser repetida con éxito por otros autores (López *et al.*, 1995; Schoofs *et al.*, 1999). Mientras que la metodología desarrollada por Dhed'a *et al.* (1991) y mejorada por Schoofs (1997) a partir de meristemos proliferantes ha sido establecida para diferentes cultivares de *Musa*. Su principal desventaja radica en los múltiples subcultivos, con altas concentraciones (22,5 mg.L⁻¹) de 6-bencilaminopurina (6-BAP), para obtener los meristemos proliferantes (Strosse *et al.*, 2004). Esta manipulación requiere de mucho tiempo, además de ser un riesgo potencial para la presencia de variantes somaclonales (Schoofs, 1999). Para atenuar esta problemática se ha utilizado el tidiazurón en la formación de los meristemos proliferantes (Suprasanna *et al.*, 2002; Sadik *et al.*, 2007). Con el mismo propósito López (2006), desarrolló un protocolo de embriogénesis somática en el cultivar Navolean (*Musa* ABB) a partir de domos de brotes axilares obtenidos mediante la incorporación de ancimídol al medio de cultivo. Aunque, estos compuestos no se reconocen en la literatura científica como causantes de variabilidad genética, el riesgo de variación somaclonal está implícito.

Las flores masculinas inmaduras han sido los explantes más utilizados para la inducción de respuesta embriogénica en gran cantidad de cultivares de *Musa*. (Grapin *et al.*, 1998; Khalil *et al.*, 2002). Sin embargo, en varios genotipos de *Musa* la parte masculina del eje es de breve duración. Con el objetivo de superar este problema, Grapin *et al.* (2000), desarrollaron cultivos embriogénicos a partir de flores femeninas inmaduras. Este tipo de

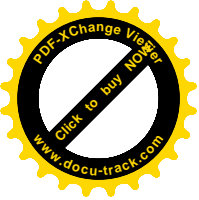


explante permite generalizar su uso a todos los cultivares de *Musa*. Sin embargo, posee limitaciones prácticas que afectan su generalización; hay que cortar la planta antes de la cosecha del fruto (López, 2006).

La gran diversidad de órganos y tejidos usados para la inducción embriogénesis somática en *Musa* spp. indican que la selección del explante inicial va a depender de las características morfológicas y genotípicas del cultivar objeto de estudio. No obstante, la baja formación de callos con estructuras embriogénicas sigue siendo uno de los principales obstáculos en el desarrollo de la embriogénesis somática (Strosse *et al.*, 2006).

Para revertir esta problemática, la investigación científica se ha orientado a determinar la concentración óptima de 2,4-D en el medio de cultivo y el efecto de la posición de las flores en el eje floral (eligiendo el meristemo floral como posición 0), cuando se utilizan flores masculinas y femeninas inmaduras (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2005). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que factores como: el genotipo, desarrollo fisiológico de la planta donadora, la edad o estado de desarrollo del órgano de la planta del cual se obtienen los explantes primarios, presentan una enorme significación en la adquisición de la respuesta embriogénica (Botti y Vasil, 1984; Parrot, 1993; Fehér, 2008; Neumann *et al.*, 2009). En plátanos y bananos, ciertos antecedentes sugieren que los parámetros mencionados anteriormente son igualmente importantes para el desarrollo de la embriogénesis somática (Escalant *et al.*, 1994; Chong *et al.*, 2005; Youssef *et al.*, 2010).

La embriogénesis somática en *Musa* spp. se presenta de forma indirecta ya que primero se produce la formación de un callo sobre el cual se pueden desarrollar o no estructuras embriogénicas (Escalant *et al.*, 1994; Côte *et al.*, 1996). Con frecuencia, la gran mayoría de los callos son no embriogénicos y sólo un pequeño porcentaje muestra desarrollo de estructuras embriogénicas (masas proembriogénicas) sobre determinadas partes del callo (Strosse *et al.*, 2003).



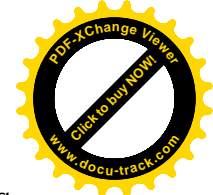
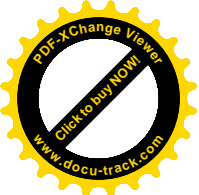
Una vez que se obtiene el callo, las secciones de este que posean estructuras embriogénicas son aisladas y utilizadas en el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas (Kosky, 1998; Jalil *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2003).

Según Strosse *et al.*, (2003), una observación cuidadosa del callo es necesaria para seleccionar callos embriogénicos donde estén en correcto equilibrio la cantidad y fase de desarrollo de las estructuras embriogénicas. Es importante la selección de tejidos embriogénicos con proembriones traslúcidos en la etapa temprana de desarrollo ontogénico y remover los embriones en la etapa de coleoptilar, glóbulos meristemáticos y callos compactos. Estos autores consideran que la tasa de éxito en la iniciación de una suspensión de celular embriogénica es de 10 a 30% y depende de la calidad la selección y de la cantidad de tejidos embriogénicos que contengan los callos (Strosse *et al.*, 2003).

Una suspensión celular embriogénica se considera establecida después de muchos meses de cultivo (generalmente de 6 a 9 meses). Estas se caracterizan por presentar alta proporción (>80%) de agregados de celulares embriogénicos, con un color que varía de amarillo brillante a pálido, una rápida precipitación de los agregados, una viabilidad de que supera el 80% y una tasa de multiplicación entre 1,5 y 2,0 ml de volumen de células sedimentadas en dos semanas de cultivo (Strosse *et al.*, 2003).

La calidad de una suspensión celular embriogénica disminuye con el número de subcultivos. Esto produce como resultado una creciente probabilidad de contaminación microbiana y una reducción en la tasa de crecimiento y capacidad de regeneración (Georget *et al.* 2000). También se presenta una relación directa entre el tiempo de cultivo y la variación somaclonal (Côte *et al.*, 2000).

A partir de suspensiones celulares embriogénicas es posible la formación de embriones somáticos con capacidad para propagarse mediante multiplicación secundaria o repetitiva (Strosse *et al.*, 2003; Khalil y Elbanna, 2004). Este procedimiento se ha efectuado generalmente sobre medio de cultivo semisólido (Escalant *et al.*, 1994; Daniels *et al.*, 2002; Khalil *et al.*, 2002; Strosse *et al.*, 2006) y en menor cuantía, se ha referido la



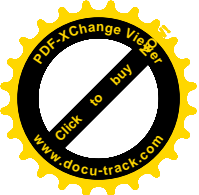
formación de embriones en medio de cultivo líquido (Cabrera *et al.*, 2002; Barranco *et al.*, 2009).

En el cultivar 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), Daniels *et al.* (2002) desarrollaron un protocolo de transformación genética utilizando la embriogénesis somática como sistema de regeneración de plantas. Estos resultados sentaron las bases para la formación de embriones en medio de cultivo semisólido. Sin embargo, la utilización de medios de cultivo en estado líquido presenta numerosas ventajas para la propagación *in vitro* de plantas por embriogénesis somática (Kosky *et al.*, 2002). Su empleo es una condición indispensable para la automatización y reducción de costos (Ducos *et al.*, 2007).

A pesar del progreso que presenta la embriogénesis somática en diferentes cultivares de *Musa spp.*, su empleo para la propagación comercial no se considera en la actualidad un método rutinario (Jalil *et al.*, 2003; Khalil y Elbanna, 2004; Ramírez *et al.*, 2006; Jalil *et al.*, 2008). La asincronía que caracteriza a los cultivos embriogénicos, dado por la presencia de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo ontogénico (globular, escutelar y coleoptilar), atenta contra la planificación y secuencia de procedimientos que deben llevarse a cabo en un proceso productivo (García-Águila *et al.*, 2006).

En las musáceas, es muy limitada la información detallada referente a las características morfológicas del embrión somático y es difícil la identificación de sus etapas de desarrollo ontogénico por ser una especie monocotiledónea. La caracterización morfológica e histológica de los embriones somáticos contribuirá a identificar sus etapas de desarrollo y definir condiciones de cultivo que favorezcan la sincronización de los cultivos embriogénicos (Jalil *et al.*, 2008).

Para lograr una eficacia del proceso de embriogénesis somática se ha de disponer de un protocolo que sea fiable, reproducible y aplicable a diferentes genotipos. También es necesario que se genere material vegetal fiel al donante sin variación somaclonal, por esta causa resulta importante la evaluación de las plantas en campo.



2.3 Estabilidad genética de plantas de *Musa* procedentes del cultivo *in vitro*

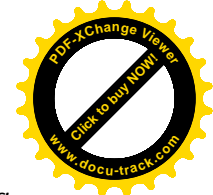
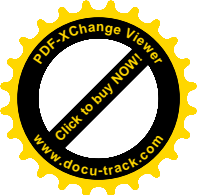
2.3.1 Caracterización morfológica y agronómica

Los caracteres morfológicos y agronómicos se han utilizado para la detección de variación somaclonal en plantas procedentes del cultivo de tejidos, especialmente en plantas regeneradas a partir de ápices meristemáticos (organogénesis), por ser el método de propagación *in vitro* más utilizado (Sandoval *et al.*, 1997). Este término se ha utilizado para describir los cambios fenotípicos y genotípicos que ocurren en las plantas regeneradas del cultivo de células y tejidos (Jain, 2001). Sin embargo, existen pocos estudios sobre estabilidad genética en plantas obtenidas a partir de embriones somáticos. Entre estos estudios, se destacan los trabajos de Côte *et al.* (2000) con una población de 500 plantas del cultivar 'Grande Naine' (*Musa* AAA) regeneradas a partir de suspensiones celulares embriogénicas y referidos por Kosky *et al.* (2006) durante la evaluación de 1500 plantas del cultivar híbrido de banano 'FHIA-18' (*Musa* AAAB) procedentes de embriones somáticos. Estos autores, caracterizaron morfológicamente y agronómicamente las plantas y observaron menos del 1,0% con cambios fenotípicos. Entre ellas se presentaron plantas con crecimiento retardado (enanas), cambios en la coloración del pseudotallo, peciolos con aletas reforzadas y cambios en el haz de las hojas. La evaluación en campo de la variación somaclonal es importante para el éxito de la propagación *in vitro*.

2.3.2 Marcadores moleculares del ADN

Los marcadores moleculares del ADN se definen como segmentos particulares de ADN que evidencian polimorfismos que puede localizarse en una región codificante o no codificante, y revelar la ocurrencia de cambios genéticos entre dos o más individuos (Palombi y Damiano, 2002; Picca *et al.*, 2004; Azofeifa-Delgado, 2006) y que idealmente son representativos a nivel del genoma completo (Agarwal *et al.*, 2008).

El empleo de marcadores moleculares de ADN constituye una herramienta útil para complementar las evaluaciones de campo. En el género *Musa* se han utilizado

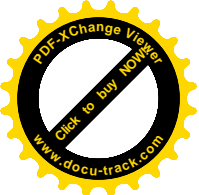


principalmente en estudios de diversidad genética. Por ejemplo, los RFLP (del inglés *Restriction fragment length polymorphism*) en la determinación del linaje del complejo *Musa* (Carreel *et al.*, 2002) y para investigar el origen de los bananos de interés comerciales (Raboin *et al.*, 2005). Los RFLP combinados con microsatélites se utilizaron además, para el análisis de la estructura poblacional de este género (Ge *et al.*, 2005).

Por su parte, mediante los RAPD (del inglés *Random amplified polymorphic DNA*) se ha identificado marcadores ligados a los genomas *Acuminata* (A) y *Balbisiana* (B) (Pillay *et al.*, 2000), se han determinado plantas fuera de tipo procedentes del cultivo *in vitro* (Kaepler *et al.*, 2000), así como el centro y diversidad de la especie *Musa balbisiana* (Uma *et al.*, 2006). Además, Carreel *et al.* (2002) presentaron la caracterización del germoplasma de *Musa* conservado en el banco genes de INIBAP con marcadores microsatélites STMS (del inglés, *Sequence Tagged Microsatellite Sites*).

Engelborghs *et al.* (1998) fueron los primeros en informar la conveniencia de utilizar AFLP en el género *Musa* para la evaluación de la variación genética comparando germoplasma y variantes somaclonales estrechamente relacionadas. Estos autores probaron el potencial que tiene esta técnica para la caracterización de las accesiones muy parecidas y la detección temprana de variantes enanas en el cv. 'Curare Enano'. También la técnica de AFLP ha sido utilizada para evaluar la diversidad genética en musáceas (Wong *et al.*, 2001; Tugume *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007). Además, Hernández *et al.* (2007), realizaron un estudio de caracterización molecular y morfoagronómico de tres variantes de plátano del clon 'CEMSA ¾' (*Musa* AAB), utilizando como marcador genético AFLP.

Por tanto, la técnica de AFLP puede ser una herramienta confiable para la caracterización molecular de las plantas regeneradas por embriogénesis somática del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

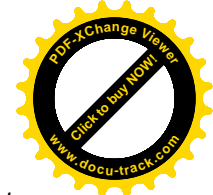
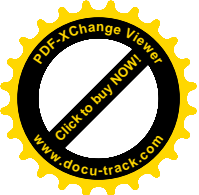
La investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), Santa Clara, durante el período comprendido entre Enero del 2004 y Diciembre del 2009. Las evaluaciones en campo se llevaron a cabo en la finca “La Victoria” ubicada en el municipio de Bayamo, provincia Granma.

Procedimientos generales

Los medios de cultivo en estado semisólido y líquido fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1,2 kg.cm⁻². El tiempo de la esterilización varió en dependencia del volumen de medio de cultivo, según SIGMA (1991). El pH fue ajustado con el uso de ácido clorhídrico (HCl) 0,5 N de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 N, previo a la esterilización. En el caso del empleo de medio de cultivo líquido, se utilizaron Erlenmeyers de diferentes volúmenes, los cuales se especifican en cada experimento. Para los medios de cultivo semisólidos (2,5 g.L⁻¹ de Gelrite® SIGMA) se utilizaron frascos de vidrio y frascos plásticos con 250 ml y 500 ml de capacidad total, respectivamente.

La cristalería y otros accesorios empleados en la manipulación de las suspensiones celulares, fueron esterilizadas en estufa a 180°C durante dos horas. Para el trabajo con las suspensiones celulares, las pipetas fueron utilizadas con la ayuda de un dispensador manual para pipetas modelo *PIPET-AID*

El instrumental (pinzas, espátulas y bisturíes), se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo *DENT-EQ* que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar, donde se realizó el manejo del material vegetal (establecimiento, subcultivos y cambios de medios de cultivo).



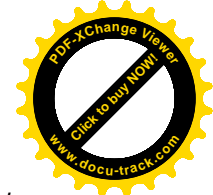
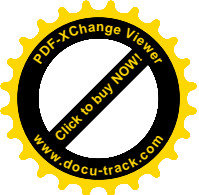
Para el análisis histológico de los embriones somáticos, estos se colocaron durante 24 horas en una solución de fijación que contenía formaldehído al 37% (v/v), ácido acético glacial al 100% (v/v) y alcohol etílico al 70% (v/v), en una proporción 1:1:18. La deshidratación progresiva de las muestras se realizó en soluciones de alcohol de graduación creciente comenzando con el alcohol de 70° hasta llegar al alcohol etílico absoluto y la inclusión se realizó en bloques de parafina (Kraus y Arduin, 1997). Los cortes se realizaron a 10 μ m con un micrótopo rotatorio Heidelberg HM 320 y posteriormente se tiñeron con safranina (0,1%) para el examen general del tejido (Jensen, 1962) y con reactivo de Schiff (PAS) para visualizar sustancias de reserva (almidón y otros polisacáridos insolubles) (Feder y O'Brien, 1968).

Las imágenes de los cultivos embriogénicos y de las secciones histológicas de los embriones somáticos fueron captadas con una cámara digital (OLYMPUS DP70) acoplada a los microscopios.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete computacional SPSS (del inglés, *Statistical Package for the Social Sciences*) versión 18,0 sobre Windows. Primeramente, a los datos experimentales se les comprobó los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Las pruebas según el cumplimiento de los supuestos se efectuaron con un nivel de significación del 95,0% y se especifican en cada experimento.

Material vegetal

Las plantas del cultivar 'FHIA-21' se seleccionaron de una plantación comercial perteneciente a la Empresa de Cultivos Varios "La Esmeralda", ubicada en la provincia de Camagüey. Para el desarrollo de la investigación se utilizaron 240 plantas élites con 10 meses de cultivo. Estas presentaron características morfológicas y agronómicas acorde al descriptor técnico propuesto por la FHIA (2002) para este cultivar.



Las plantas élites se analizaron por serología para el diagnóstico del Virus del mosaico del pepino (CMV, por sus siglas del inglés: *Cucumber Mosaic Virus*) y el Virus estriado del banano (BSV, del inglés: *Banana Streak Virus*). Se utilizó el sistema comercial AGDIA (ELISA-DAS) y se siguieron las instrucciones del fabricante. La interpretación de los resultados se realizó tomando en cuentas las consideraciones realizadas por Peralta y Villoch (1999). Estos autores establecieron como muestra positiva aquella cuyo valor de absorbancia fuera el doble del valor del control negativo. Un total de 204 plantas fueron diagnosticadas como negativas para ambos virus. Los brotes florales masculinos de estas plantas, después de emitida las flores femeninas de la inflorescencia, se utilizaron como material vegetal para el inicio del proceso de embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras.

En el laboratorio, los brotes masculinos se cortaron a la mitad, se eliminaron las brácteas cercanas al ápice y se redujo aproximadamente a 3,0 cm su longitud. Dentro de la cámara de flujo laminar se realizó la desinfección con una solución de etanol al 70% (v/v) durante 15 minutos y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico (OLYMPUS) se extrajeron las flores masculinas inmaduras y se utilizaron como explantes las que se hallaban de la posición cinco a la 14 (eligiendo el meristemo floral como posición 0) (Figura 1) (Escalant *et al.*, 1994; Daniels *et al.*, 2002).

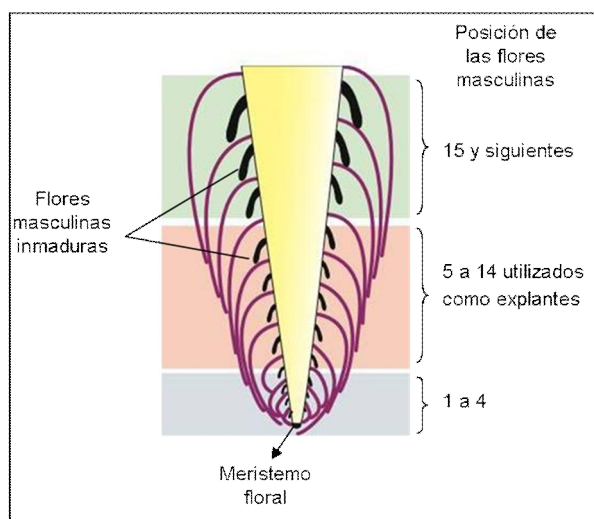


Figura 1. Localización de las flores masculinas en el eje del brote floral masculino de la inflorescencia de *Musa* spp (Modificado de Strosse *et al.*, 2003).

La investigación se desarrolló en tres etapas, en las cuales se realizaron experimentos seriados según el desarrollo del proceso de embriogénesis somática en *Musa* spp. En la primera etapa, los experimentos estuvieron relacionados con la fase de inducción de callos con estructuras embriogénicas a partir de flores masculinas inmaduras y el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas. En la segunda etapa de la investigación, los experimentos se orientaron a la regeneración de plantas que incluye las fases de formación, maduración y germinación de embriones somáticos. Para posteriormente, en la tercera etapa evaluar la respuesta de las plantas *ex vitro* mediante experimentos que se desarrollaron en casa de cultivo y campo (Figura 2).

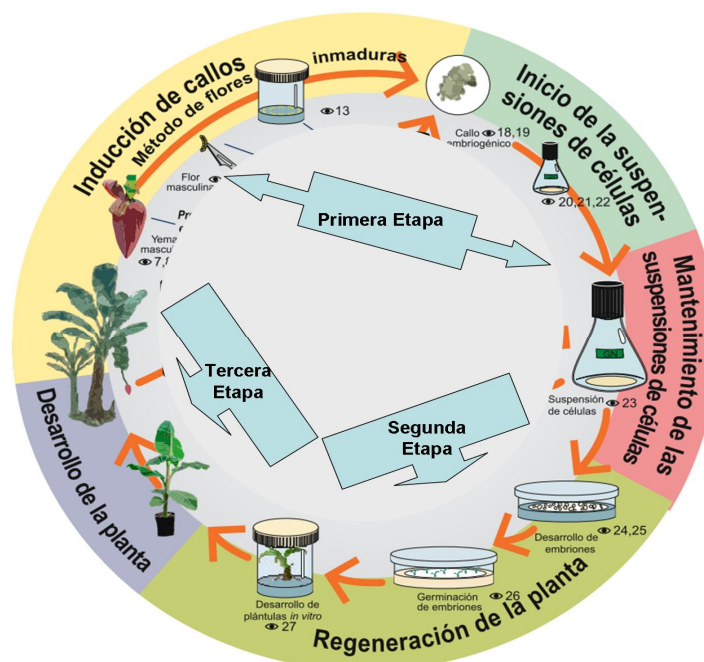


Figura 2. Etapas de la investigación según la fase de desarrollo del proceso de embriogénesis somática en *Musa* spp (Modificado de Strosse *et al.*, 2003).

3.1 Selección del explante inicial para la formación de callos con estructuras embriogénicas y establecimiento de suspensiones celulares

3.1.1 Formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de flores masculinas inmaduras

El experimento se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la posición del brote floral masculino en la planta donadora sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de flores masculinas inmaduras. Se establecieron cuatro tratamientos, donde los brotes masculinos se seleccionaron a diferentes distancias de la última flor femenina de la inflorescencia. Se colectaron brotes masculinos con 0, 10, 20, 30 cm de longitud del raquis (Figura 3 A, B) y se extrajeron un total de 490, 442, 267 y 306 flores masculinas inmaduras de cada tratamiento, respectivamente. Este experimento fue repetido tres veces en el tiempo, con diseño completamente al azar.

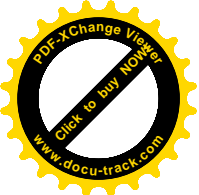


Figura 3. Inflorescencia del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) (A) Brote floral masculino después de emitida la última flor femenina. (B) Brote floral masculino con 10 cm de longitud del raquis.

Se colocaron cinco grupos de flores masculinas inmaduras (cada grupo de flores se consideró un explante) sobre 30 mL del medio de cultivo propuesto por Daniels *et al.* (2002) para la formación de callos con estructuras embriogénicas en el cv. 'FHIA-21'. Este medio de cultivo contenía sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas MS; 1,0 mg.L⁻¹ de biotina; 4,0 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 1,0 mg.L⁻¹ de ácido indol-3-acético (AIA); 1,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 30 g.L⁻¹ de sacarosa. El pH fue ajustado a 5,8 previo a los 20 minutos de esterilización.

Los frascos de cultivo fueron sellados con *Parafilm*® y se colocaron en cámaras de crecimiento durante 20 semanas. En este período, no se efectuó cambio de medio de cultivo y los explantes permanecieron en oscuridad total a 27±2,0°C. Se realizaron observaciones cada siete días y se efectuó una descripción del desarrollo de las flores masculinas inmaduras hasta la formación de callos con estructuras embriogénicas.

A las 20 semanas de cultivo, se cuantificó el número de flores masculinas inmaduras con respuesta embriogénica, o sea con formación de callos con estructuras embriogénicas. Los callos se clasificaron de acuerdo a las características de sus estructuras embriogénicas (masa fresca y desarrollo ontogénico de las estructuras embriogénicas).



Las observaciones se realizaron con el empleo de un microscopio estereoscopio (OLYMPUS) y la masa fresca (mgMF) se determinó con una balanza analítica modelo SARTORIUS. Estas operaciones se efectuaron dentro de la cámara de flujo laminar.

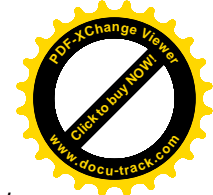
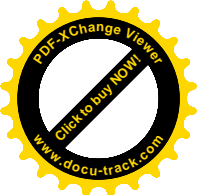
A partir de estos resultados se seleccionará la ubicación del brote masculino en la planta donadora en la cual las flores masculinas inmaduras (explante inicial) formaron el mayor número de callos con estructuras embriogénicas. La comparación de los valores medios correspondientes al número de callos con estructuras embriogénicas se realizó mediante una prueba de *Kruskal-Wallis* con nivel de significación de 95,0%.

3.1.2 Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de callos con estructuras embriogénicas

El establecimiento de las suspensiones se inició a partir de 150 mgMF de estructuras embriogénicas procedentes de dos tipos de callos que se seleccionaron en el experimento anterior. Estas se adicionaron en Erlenmeyers (25 mL de volumen total) que contenían 3,0 mL de medio del cultivo líquido. Se utilizó el medio de cultivo propuesto por Bieberach (1995) y modificado por Daniels *et al.* (2002) para 'FHIA-21', el cual estaba compuesto por sales y vitaminas MS al 100%; 0,5 mg.L⁻¹ de biotina; 100 mg.L⁻¹ de L-glutamina; 100 mg.L⁻¹ de extracto de malta; 3,0 mg.L⁻¹ 2,4-D y 45 g.L⁻¹ de sacarosa. El pH fue ajustado a 5,3 previo a los 15 minutos de esterilización. Se establecieron 10 réplicas por cada tratamiento (tipo de callo/ Erlenmeyers).

Las condiciones de cultivos fueron en oscuridad total a 27±2,0°C y los Erlenmeyers se colocaron en un agitador orbital (*INFORS HT*) a 90 rpm. Se renovó un 50 % del medio de cultivo cada 7 días durante las primeras 4 semanas de cultivo y cada 15 días durante las siguientes semanas de cultivo (Strosse *et al.*, 2003).

A los 10 días se efectuó el tamizado de las suspensiones celulares, con filtros de malla metálica de 500 µm de diámetro de poro (Daniels *et al.*, 2002). En la medida que se



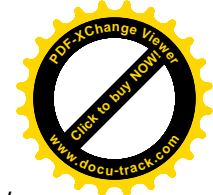
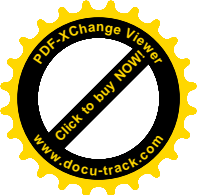
liberaba agregados embriogénicos y ocurría su multiplicación se hicieron transferencia a Erlenmeyers de mayor capacidad siguiendo el procedimiento descrito en la Guía técnica del INIBAP para el establecimiento de suspensiones celulares de banano (Strosse *et al.*, 2003).

Para evaluar el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas, a las 4, 8, 12 y 16 semanas de cultivo y se midió el volumen de células y agregados celulares embriogénicos sedimentados por el método propuesto por Schoofs (1997). Este consistió en la transferencia del contenido filtrado a tubos de ensayo cónicos estériles de 15 mL y la determinación del volumen que ocupan los agregados celulares embriogénicos después de dos minutos de sedimentación. Además, se realizaron observaciones al microscópico óptico (AXIOSKOP) para describir las características de su composición.

A los 6 meses de cultivo se cuantificó el número de suspensiones celulares embriogénicas establecidas. Se consideró como criterio de evaluación las siguientes variables: alta proporción de agregados de celulares embriogénico con rápida sedimentación (un minuto), viabilidad superior al 80% y tasa de multiplicación entre 1,5 y 2,0 ml de volumen de células sedimentadas en dos semanas de cultivo (Strosse *et al.*, 2003).

La vitalidad se determinó con el uso de diacetato de fluoresceína (FDA) (Widholm, 1972). Se utilizó el microscopio óptico modelo AXIOSKOP con excitación a 450-490 nm y fluorescencia 510-520 nm. A partir de la cuantificación de los agregados celulares embriogénicos con fluorescencia se compararon los resultados de las suspensiones celulares embriogénicas procedentes de ambos tipos de callos.

Para la comparación de los valores correspondientes al volumen de células sedimentadas se aplicó la prueba *T-Student*, mientras que el número de suspensiones celulares embriogénicas establecidas se comparó con la prueba *Mann-Whitney*. Ambas con un nivel de significación de 95,0%.



3.2 Efecto de la densidad de inoculación sobre la formación y maduración de embriones somáticos en medio de cultivo líquido

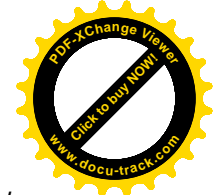
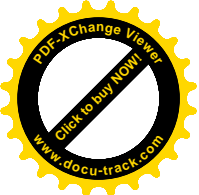
Para determinar el efecto de la densidad de inoculación sobre la formación y maduración de los embriones somáticos se realizaron los siguientes experimentos.

3.2.1 Formación de embriones somáticos

Este experimento se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la densidad de inoculación sobre la formación de embriones somáticos en medio de cultivo líquido a partir agregados celulares embriogénicos. Para ello, se adicionaron 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 g de masa fresca (gMF) de agregados celulares embriogénicos en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad, que contenían 30 mL de medio de cultivo. Se utilizó un medio de cultivo compuesto por el 100% de las sales inorgánicas SH (Schenk e Hildebrandt, 1972), al que se adicionaron vitaminas MS al 100%, 0,5 mg.L⁻¹ de biotina, 100 mg.L⁻¹ de extracto de malta, 100 mg.L⁻¹ de L-glutamina, 230 mg.L⁻¹ de L-prolina, 10 mg.L⁻¹ de lactosa, 0,05 mg.L⁻¹ de zeatina, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0,2 mg.L⁻¹ ANA, 0,2 mg.L⁻¹ de isopenilaminopurina (2ip), 0,1 mg.L⁻¹ de Kinetina y 45 g.L⁻¹ de sacarosa (Daniels *et al.*, 2002). El pH se ajustó a 5,3 antes de la esterilización por autoclave.

Los Erlenmeyers de cultivo se colocaron en agitador orbital (*INFORS HT*) a 90 rpm de velocidad de rotación, en oscuridad total y 27±2,0 °C por 30 días. A los 15 días de cultivo, se renovó el 50% el medio de cultivo siguiendo el procedimiento descrito por Strosse *et al.* (2003) para suspensiones celulares embriogénicas. Se establecieron cinco repeticiones por cada tratamiento (densidad de inoculación) con un diseño experimental completamente aleatorizado.

A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos formados en cada tratamiento. Para ello, se extrajeron 500 µL, con una micropipeta (SOCOREX) de 1



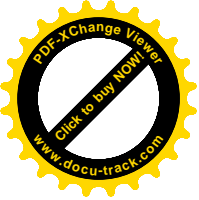
000 μL , de cada Elenmeryers y se adicionaron en un vaso de precipitado (50 mL de capacidad) que contenía 30 mL de una mezcla de Gelrite® (SIGMA) ($2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y agua. La mezcla se vertió en placas de Petri de 70 mm de diámetro. Para el conteo de los embriones se dividió en cuatro partes la placa de Petri y cada cuadrante se tomó como unidad experimental ($n=20$). Estas observaciones se realizaron a 100x de aumento con un microscopio estereoscópico (OLYMPUS).

Los datos experimentales se procesaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y la comparación de los valores medios se efectuó mediante la prueba de Dunnett C con significación de 95,0%.

3.2.1.1 Morfología e histología de los embriones somáticos

Este estudio se realizó con el objetivo de describir la morfología y características de los tejidos de los embriones somáticos formados en cada tratamiento del experimento anterior (acápite 3.2.1). Para ello, se realizaron observaciones de los cultivos embriogénicos cada tres días y hasta los 30 días de cultivo con el microscopio estereoscópico invertido modelo WILD M8 (LEICA) (250x).

A los 30 días de cultivo se evaluó la sincronización de los cultivos embriogénicos a partir de la longitud de los embriones somáticos. La medición se efectuó por su sección más larga con el auxilio de una escala micrométrica acoplada al ocular de un microscopio estereoscópico (OLYMPUS) (100x). Para ello, se extrajeron 100 μL de embriones en suspensión de cada tratamiento y se adicionaron en placas de Petri de 70 mm de diámetro siguiendo el procedimiento descrito en el acápite anterior para el conteo de los embriones (3.2.1). Los datos correspondientes a la longitud de los embriones somáticos se agruparon en cuatro rangos para determinar su frecuencia de aparición (%) en cada uno de los tratamientos (densidad de inoculación).



A los 30 días de cultivo, también se realizó un análisis histológico de los embriones somáticos formados en cada tratamiento. Las secciones histológicas se observaron en microscopio óptico (AXIOSKOP) (400x). A partir de los resultados se seleccionó la densidad de inoculación con embriones somáticos de características morfológicas e histológicas homogéneas (mayor sincronización).

3.2.1.2 Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo

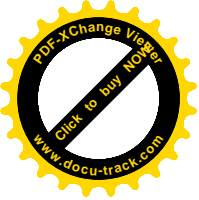
El experimento se realizó con el objetivo de relacionar la respuesta en cuanto a la formación de embriones somáticos del cv. 'FHIA-21' con el contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo. Para ello, se determinó el contenido de calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn) en el medio de cultivo que contenía 0,5 y 1,5 gMF/30mL de densidad de inoculación.

En este estudio se establecieron cinco repeticiones por cada tratamiento y las muestras (10 mL) se tomaron cada tres días hasta finalizar el período de cultivo (30 días). Como control se utilizó un medio de cultivo estéril sin agregados celulares embriogénicos. El análisis de las muestras se realizó por espectroscopia de absorción atómica (SP-9, PYE UNICAM), siguiendo la metodología de Smith y Scherk (1972). Para la determinación del Ca, Mg y K se realizaron diluciones a las muestras 1:5, mientras, que el contenido de Fe, Cu, Mn y Zn se determinó en la muestra original. Los datos se expresaron en mg.L⁻¹.

La comparación de los valores del contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo se realizó mediante la prueba de *Mann Whitney*, con nivel de significación de 95,0%.

3.2.2 Maduración de embriones somáticos

Los embriones somáticos que se formaron en el experimento anterior en la mejor densidad de inoculación fueron colocados en medio de cultivo líquido de maduración con



el objetivo de proporcionar la continuación de su desarrollo, el cual finalizará con su germinación y formación de plantas completas.

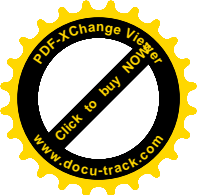
En este experimento se determinó el efecto de la densidad de inoculación sobre la maduración de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido. Se adicionaron 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 gMF de embriones somáticos en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio de cultivo para la maduración de embriones somáticos. Se utilizó el medio de cultivo propuesto por Kosky *et al.* (2000), compuesto por sales MS al 100%, vitaminas MS al 100%, 1,0 mg.L⁻¹ de biotina, 0,5 mg.L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 1,0 mg.L⁻¹ de AIA y 45 g.L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5,8 antes de la esterilización.

Los Erlenmeyers de cultivo se colocaron en condiciones de oscuridad total y 27±2,0 °C durante 30 días (Kosky *et al.*, 2000). Se establecieron cinco repeticiones por cada tratamiento con un diseño experimental completamente aleatorizado.

A los 30 días de cultivo se observaron las características morfológicas e histológicas de los embriones somáticos (acápite 3.2.2.1), se realizó un análisis del contenido final de nutrientes minerales en el medio de cultivo (acápite 3.2.2.2) y posteriormente los embriones somáticos se transfirieron a medio de cultivo semisólido para su germinación (acápite 3.2.2.3). Estos acápites se describen a continuación.

3.2.2.1 Morfología e histología de los embriones somáticos

A los 30 días de cultivo se realizó una descripción morfológica de los embriones somáticos y se evaluó la sincronización de los cultivos a partir de su longitud. Para ello, se extrajeron con una micropipeta (SOCOREX) 1000 µL de suspensión con embriones somáticos y se adicionaron en placas de Petri de 70 mm de diámetro, siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 3.2.1 para el conteo de los embriones. La medición de los embriones somáticos se efectuó según el procedimiento descrito en el acápite



3.2.1.1. Se establecieron tres rangos de longitudes para evaluar la sincronización de los cultivos embriogénicos en la fase de maduración.

Adicionalmente, se realizó el análisis histológico de los embriones somáticos para identificar estructuras anatómicas que mostraran su desarrollo ontogénico. La observación de las secciones histológicas se realizó en microscopio óptico (AXIOSKOP) (400x).

3.2.2.2 Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo

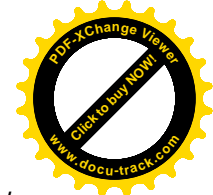
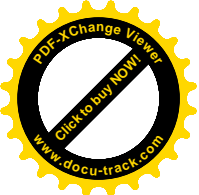
El experimento se realizó con el objetivo de relacionar la participación del Ca, Mg, potasio K, Fe, Cu, Mn y Zn en el desarrollo de los embriones somáticos durante la fase de maduración. Se determinó el contenido final de los nutrientes minerales en el medio de cultivo con 0,2 y 0,6 gMF/30mL de densidad de inoculación.

En este estudio se establecieron cinco repeticiones por cada tratamiento y las muestras (10 mL) se tomaron al finalizar el período de cultivo (30 días). Como control se utilizó un medio de cultivo estéril sin embriones somáticos. El análisis de las muestras se realizó por espectroscopia de absorción atómica (SP-9, PYE UNICAM), siguiendo la metodología de Smith y Scherk (1972). Para la determinación del Ca, Mg y K se realizaron diluciones a las muestras 1:5; mientras que el contenido de Fe, Cu, Mn y Zn se determinó en la muestra original. Los datos se expresaron en mg.L^{-1} .

La comparación de los valores del contenido de final de nutrientes minerales en el medio de cultivo se realizó mediante la prueba de *Mann Whitney* con nivel de significación de 95,0%.

3.2.2.3 Efecto de la densidad de inoculación sobre la germinación de los embriones somáticos

Para determinar el efecto de la densidad de inoculación utilizada durante la fase de maduración (0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 gMF/30mL) sobre la capacidad de germinación de los



embriones, estos se transfirieron a un medio de cultivo semisólido propuesto por Kosky *et al.* (2000) para la germinación. Este contenía sales MS, vitaminas MS, 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP, 2,0 mg.L⁻¹ de AIA, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0,01 mg.L⁻¹ de Biobrás-6, 30 g.L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5,8 antes de la esterilización (20 minutos).

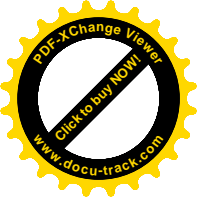
Se utilizaron frascos plásticos con 50 ml de medio de cultivo y se colocaron en cámara de crecimiento de luz artificial (tubos fluorescentes de luz blanca) con un fotoperiodo de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 62-68 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $27\pm 2,0$ °C. Se establecieron ocho réplicas (frascos) por tratamiento, con 20 embriones somáticos cada una, en un diseño experimental completamente aleatorizado.

Durante la geminación de los embriones somáticos hasta la formación de las plantas se realizó una descripción morfológica del proceso. Estas observaciones se efectuaron a los 10, 20 y 30 día de cultivo con un microscopio estereoscópico (OLYMPUS) (100x).

A los 30 días de cultivo, se cuantificó el número de embriones somáticos germinados y los valores se expresaron en porcentaje. Además, se evaluaron características morfológicas de las plantas como: longitud del pseudotallo (cm) desde la base hasta la inserción de la primera hoja, número de hojas expandidas y número de raíces. Posteriormente, las plantas fueron transferidas y mantenidas durante 30 días en medio de cultivo semisólido de elongación previo a su traslado a condiciones *ex vitro* en casa de cultivo.

A partir de los resultados se seleccionó la densidad de inoculación que proporcionó mayor sincronización en el desarrollo de los embriones somáticos, dado por una satisfactoria germinación y formación de plantas completas.

La comparación de los valores en todas las variables evaluadas se efectuó mediante la prueba de *Kruskall Wallis*, con un nivel de significación de 95,0%.



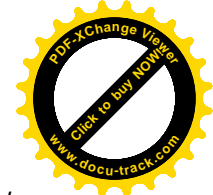
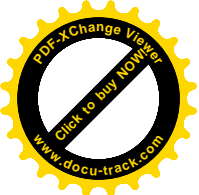
3.3 Caracterización morfológica, agronómica y molecular de plantas regeneradas por embriogénesis somática

3.3.1 Evaluación en casa de cultivo de plantas obtenidas por cultivo *in vitro*

Para determinar la conversión de las plantas regeneradas por embriogénesis somática (supervivencia y desarrollo en condiciones ambientales *ex vitro*) se transfirieron a la casa de cultivo plantas con una longitud del pseudotallo de 2,5 a 3,5 cm con más de dos hojas expandidas y con dos a tres raíces (6 264 plantas). Estas se plantaron junto a una población de 2 000 plantas obtenidas por organogénesis, las cuales presentaron similares características morfológicas (IBP, 2005). Esta población se utilizó como tratamiento control durante las evaluaciones en casa de cultivo y campo.

La aclimatización de las plantas se desarrolló según la metodología propuesta por Pérez *et al.* (1999) en condiciones semicontroladas. Se utilizaron envases de polieturano con capacidad de 120cm³ de sustrato, el cual estuvo compuesto por una mezcla de humus de lombriz (80%) y zeolita (20%).

La fertilización se efectuó por aspersion con fórmula completa 8:13:21 (N-P-K) a razón de 2,5g.L⁻¹, con una frecuencia de dos aplicaciones por semana. El riego se realizó con microaspersión de baja presión (2,0 kg.cm⁻² y un caudal de 122 L.h⁻¹) mediante sistema *Microjet*. Durante las dos primeras semanas se efectuaron cuatro riegos diarios (8:00am, 10:00am, 12:00m y 4:00pm) de un minuto cada uno y posteriormente la frecuencia se redujo a tres riegos (8:00am, 12:00m y 4:00pm) de dos minutos de duración. Con esta frecuencia se garantizó una humedad relativa del 80,0 al 90,0% en el interior de la casa de cultivo. Mientras que la intensidad luminosa se reguló mediante una malla sombreadora plástica de color negro, que permitió el paso de 70% de la luz solar. La intensidad de fotones fotosintéticos fue 3 361 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}$, medido con Extech Light Meter 401025, EUA.



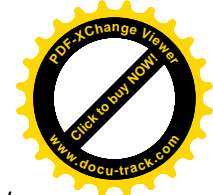
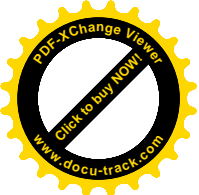
A los 10 días de cultivo se cuantificó el número de plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia. Adicionalmente, durante todo el período de cultivo se siguió la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997) para detectar la presencia de plantas con cambios fenotípicos en esta fase. El criterio de evaluación incluyó todos los cambios observados con respecto a las plantas propagadas por organogénesis.

Con el objetivo de comparar morfológicamente ambas poblaciones, a los 55 días, fueron seleccionadas 100 plantas al azar para medir la altura (cm) desde la base hasta la inserción en **V** de las últimas hojas emitidas y cuantificar el número de hojas expandidas por planta. Las plantas que presentaron de 20 a 25 cm de altura del pseudotallo, de cinco a seis hojas expandidas y buen desarrollo del sistema radicular (más de ocho raíces) fueron llevadas a campo. Estas características se corresponden con los indicadores de calidad establecidos en el instructivo técnico IBP (2005) para plantas de plátanos y bananos regeneradas por organogénesis.

Los datos correspondientes al porcentaje de supervivencia se compararon mediante la prueba *Mann-Whitney* para un 95,0% de significación. La comparación de los valores en las variables morfológicas se efectuó mediante un análisis de varianza de clasificación simple mediante la prueba de *Tukey*.

3.3.2 Evaluación en campo de caracteres morfológicos y agronómicos de las plantas

Para caracterizar morfológica y agronómicamente las plantas obtenidas por embriogénesis somática se realizó un experimento con un diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones. Se emplearon 6 188 plantas regeneradas por embriogénesis somática, 1 972 plantas obtenidas por organogénesis e igual cantidad de plantas procedente de semilla asexual (cormo). Las poblaciones cubrieron un área de 3,5 ha con 80 plantas por surco a una distancia de plantación de 3x 2x 1,20m, en un suelo



Fluvisol Millido Carbonatado según la clasificación de Hernández *et al.* (2005). Las atenciones culturales se efectuaron conforme el Instructivo técnico del cultivo del plátano (INIVIT, 2007) y el promedio anual de temperatura fue de 28,5 °C. Durante el desarrollo del experimento no se realizaron aplicaciones de fungicidas.

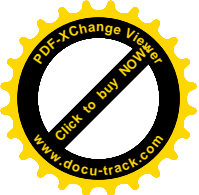
A los 6, 10 y 14 meses después de la plantación se observó el total de plantas de cada población para cuantificar el número de plantas con cambios fenotípicos. El criterio de evaluación incluyó todos los cambios observados con respecto al descriptor técnico para el cultivar 'FHIA 21' desarrollado por la FHIA (2002).

En el momento de la floración (10 meses) se midió la altura (m) desde la base de la planta hasta la inserción en forma de **V** de las últimas hojas emitidas y la circunferencia del pseudotallo (cm) medida a un 1,0 m de la base de la planta. En el momento de la cosecha (14 meses) se evaluaron los caracteres agronómicos tales como: peso neto del racimo (kg), número de manos por racimo, número de frutos por racimo, longitud (cm) y circunferencia (cm) del fruto central de la segunda mano. Además se evaluó el número de hojas funcionales en el momento de la floración y en la cosecha (menos del 15% del área foliar necrótica) siguiendo el criterio establecido Carlier *et al.* (2002). Las evaluaciones se realizaron en 150 plantas de cada sistema de propagación.

Los datos experimentales se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. La comparación de los valores medios se efectuó mediante la prueba Student-Newman-Keuls (SNK), con un nivel de significación de 95,0%.

3.3.3 Análisis molecular de la estabilidad genética de las plantas

Con el objetivo de detectar marcadores a nivel molecular que indicaran si existía variabilidad genética en la población de plantas obtenida por embriogénesis somática se realizó una caracterización molecular mediante el uso de marcadores del tipo AFLP (del inglés: *Amplified Fragment Length Polymorphism*). Las muestras se tomaron de plantas con



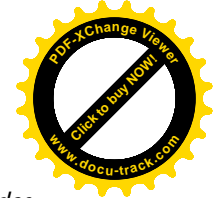
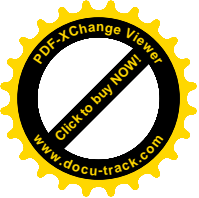
10 meses de cultivo en campo y se determinó la distancia genética dentro y entre las poblaciones de plantas regeneradas por embriogénesis somática, organogénesis y semilla asexual del cv de plátano 'FHIA 21'.

Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico

Como material vegetal se utilizaron segmentos de hojas jóvenes de 20 plantas correspondientes a cada población analizada. Las muestras incluyeron plantas fuera de tipo detectadas durante la evaluación de caracteres morfológicos (acápite 3.3.2). Para la extracción del ADN genómico se empleó el sistema comercial *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN total se determinó con un espectrofotómetro (Eppendorf, Alemania) y las técnicas moleculares estándar se utilizaron según lo descrito por Sambrook y Russell (2001). Posteriormente se igualaron las concentraciones de todas las muestras a $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Reacción de AFLP

El procedimiento para la realización de los AFLP se llevó a cabo según el método descrito por Vos *et al.* (1995). Para la doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* (5' GAATTC 3') (Fermentas Life Sciences, Alemania) y *Tru9I* (5' TTAA 3') (Fermentas Life Sciences, Alemania) se utilizó 1,0 μL del ADN y se usó el tampón C en un volumen final de 50 μL . La doble digestión se efectuó a 37°C durante 16 horas. Los fragmentos obtenidos fueron ligados con los adaptadores (Tabla 2) usando la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas Life Sciences, Alemania) con el tampón T4 ligasa (Fermentas Life Sciences, Alemania) a 16°C durante 16 horas. Una primera amplificación fue realizada a partir de 5,0 μL de la primera reacción de la ligazón y se usó una base selectiva (adenina) en el extremo 3' de los cebadores. Para la segunda amplificación se tomaron 5,0 μL de una



dilución 1/20 del resultado de la primera amplificación, en esta ocasión en el extremo 3' de los cebadores se usaron dos bases selectivas (Tabla 2).

Tabla 2. Adaptadores y cebadores usados en la reacción de preamplificación y amplificación para el análisis por AFLP.

EcoRI

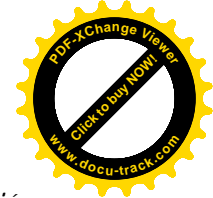
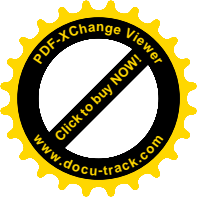
Adaptador	5' -CTCGTAGACTGCGTACC- 3' 3' -CATCTGACGCATGGTTAA- 5'
Cebador de preamplificación	5' -GACTGCGTACCAATTCa- 3'
Cebador de amplificación	5' -GACTGCGTACCAATTCaNN- 3'

Mru9I

Adaptador	5' -GACGATGAGTCCTGAG- 3' 3' -TACTCAGGACTCAT- 5'
Cebador de preamplificación	5' -GATGAGTCCTGAGTAAa- 3'
Cebador de amplificación	5' -GATGAGTCCTGAGTAAaNN- 3'

En este estudio se realizaron seis combinaciones de cebadores (E-AAT/M-ACA; E-AGG/M-AGT; E-ACA/M-ATG; E-AAG/M-CAA; E-AAA/M-TTA; E-CGG/M-ATT), elegidos por su alto porcentaje de polimorfismo en cultivares de *Musa* (Engelborghs *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Para analizar los resultados de las reacciones de amplificación, los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis vertical en gel desnaturizante de poliacrilamida al 6,5%, usando una cámara de secuenciación *Sequi-Gen GT System* (Bio-Rad, USA). Los fragmentos de ADN se visualizaron por tinción con nitrato de plata (1,0 g.L⁻¹), según recomendaciones del fabricante (PROMEGA USA).

Para el análisis estadístico de los resultados se usaron matrices binarias para codificar la presencia o ausencia de caracteres polimórficos. Las variaciones dentro y entre las muestras se asumieron como bandas polimórficas.

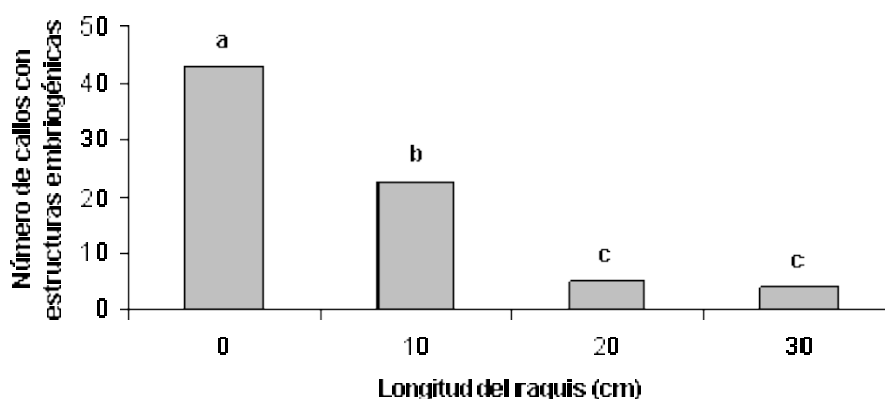


4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección del explante inicial para la formación de callos con estructuras embriogénicas y establecimiento de suspensiones celulares

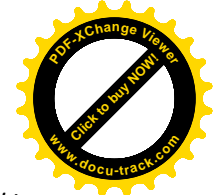
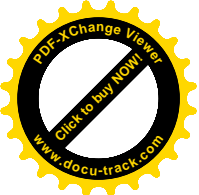
4.1.1 Formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de flores masculinas inmaduras

Los resultados mostraron que la selección del explante inicial, dado por la posición del brote floral masculino en la planta donadora, influyó en el número de callos con estructuras embriogénicas formados a partir de flores masculinas inmaduras. El mayor porcentaje se logró cuando las flores masculinas se extrajeron de brotes florales masculinos que se ubicaban después de emitida la última flor femenina (0,0 cm de longitud del raquis). Con este tipo de explante se obtuvo un 8,77% de callos con estructuras embriogénicas, a las 20 semanas de cultivo, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos evaluados (Figura 4).



Barras con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba Kruskal-Wallis, para $p \leq 0,05$

Figura 4. Efecto de la posición del brote floral masculino en la planta donadora sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de flores masculinas inmaduras del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), a las 20 semanas de cultivo.



Es de señalar, que cuando el brote floral masculino se encontraba a una mayor distancia de la última flor femenina (10, 20 y 30 cm de longitud del raquis) se redujo la formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de las flores masculinas inmaduras (Figura 4). Cuando esto ocurre la edad ontogénica del brote floral masculino y de la planta donadora es mayor con respecto a cuando está próximo a la flor femenina. Estas diferencias en la edad ontogénica se corresponden con diferencias morfológicas del brote floral masculino, por ejemplo su longitud disminuye con el aumento del eje de la inflorescencia (López, 1989).

Entre los factores asociados con la adquisición de la respuesta embriogénica se encuentran la edad y la etapa de desarrollo de la planta donadora u órganos que se utilizan como fuente de explante (Fehér, 2008). Aunque la edad ontogénica de las flores masculinas inmaduras es idéntica para los distintos brotes florales masculinos estudiados, las diferencias se encuentren en los tejidos donde se originan, lo cual pudiera estar relacionado con el contenido endógeno de fitohormonas, aminoácidos y minerales; aspectos no probados en este estudio y que podrían ser abordados en futuras investigaciones.

La composición de aminoácidos y minerales presentes en las flores masculinas inmaduras fueron determinados por Sheng *et al.* (2010), los cuales encontraron 17 tipos de aminoácidos y un predominio en el contenido de calcio, magnesio, hierro, cobre y potasio. Sin embargo, estos resultados revelaron una amplia variación en su composición cuantitativa debido a condiciones ambientales, etapa de desarrollo de las plantas y aspectos genéticos de cada cultivar.

El nivel de fitohormonas endógenas es considerado como otro de los factores críticos que influyen en potencial embriogénico de los explantes (Thomas *et al.*, 2002; Jiménez, 2005; Jiménez y Thomas, 2006). Los requerimientos auxinas u otros reguladores de crecimiento

para el inicio de la embriogénesis somática está en gran parte determinado por el nivel de desarrollo del tejido extirpado y utilizado como explante (von Arnold, 2008).

Desde el punto de vista morfológico, la iniciación de callos con estructuras embriogénicas se desarrolló de forma similar en los diferentes explantes iniciales. A las cuatro semanas de cultivo, se observó un crecimiento desordenado con la formación de estructuras globulares de color amarillo y una tonalidad marrón en la base de los explantes por la oxidación fenólica. Esta ocurre por acción de enzimas de tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas, como las ocasionadas a los explantes durante su iniciación *in vitro* (Villegas *et al.*, 2008).

A las ocho semanas de cultivo, se observó la oxidación y muerte de los primeros tejidos desarrollados y la formación de nuevas estructuras globulares de color amarillo (Figura 5 A). La oxidación fenólica no constituyó un factor inhibitorio en la inducción de la embriogénesis somática. Este aspecto, también fue observado por Villegas *et al.* (2008) donde la oxidación no afectó la formación de embriones somáticos a partir de flores masculinas inmaduras del cv. 'Grande Naine' (*Musa* AAA).

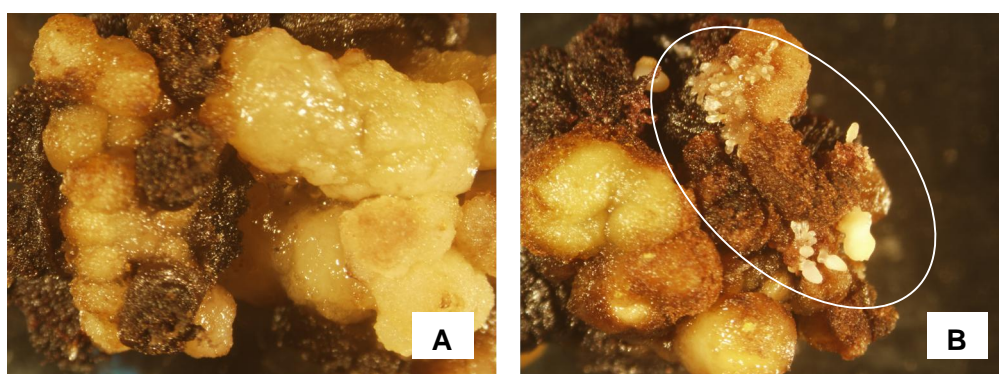


Figura 5. Formación de callos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB). (A) Callo con glóbulos amarillos a las ocho semanas de cultivo. (B) Callo con embriones somáticos aislados a las 12 semanas de cultivo.

Las primeras estructuras embriogénicas se apreciaron a las 12 semanas de cultivo sobre los glóbulos amarillos y el tejido necrótico de los explantes. Los callos con estructuras