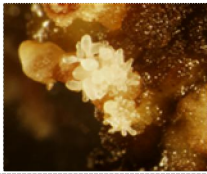
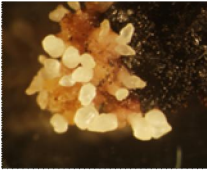

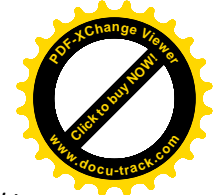
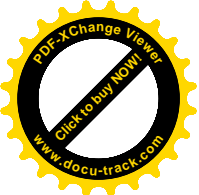


embriogénicas contenían pequeños grupos de embriones somáticos y algunos aislados (Figura 5 B). Sin embargo, el mayor número de callos con presencia de estructuras embriogénicas se observó a las 16 y 20 semanas de cultivo (datos no mostrados).

Al finalizar el período de cultivo (20 semanas), se observó un predominio de callos no embriogénicos, donde sólo se observaban estructuras globulares amarillas y tejido necrótico y en menor cuantía callos con estructuras embriogénicas. Estos últimos mostraron diferencias en cuanto a la masa fresca y desarrollo de sus estructuras embriogénicas. Por ejemplo, se observaron callos con menos de 150 mg de masa fresca (MF) de estructuras embriogénicas con pequeños grupos aislados de embriones somáticos y callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas, que variaron desde proembriones hasta embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo ontogénico. Teniendo en cuenta las observaciones realizadas, los callos con estructuras embriogénicas se clasificaron en tres tipos (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de callos con estructuras embriogénicas del cv. de plátano ‘FHIA-21’ (*Musa AAAB*) obtenidos a partir de flores masculinas inmaduras, a las 20 semanas de cultivo.

Tipo de callo	Descripción	
I	Callos con menos de 150 mg de masa fresca (MF) de estructuras embriogénicas con embriones somáticos en pequeños grupos aislados	
II	Callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas con embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo ontogénico	
III	Callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas con masa de proembriones y embriones somáticos en etapas tempranas de desarrollo ontogénico	



Esta clasificación tiene gran importancia para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas porque podría contribuir a la eficiencia de esta fase del proceso embriogénico. Según Strosse *et al.* (2003), una observación cuidadosa del callo es necesaria para seleccionar callos embriogénicos donde estén en correcto equilibrio la cantidad y etapa de desarrollo de las estructuras embriogénicas.

Los tres tipos de callos con estructuras embriogénicas fueron identificados en los cuatro tratamientos. Sin embargo, al analizar su frecuencia de aparición se observó en los resultados la influencia de la edad ontogénica del brote floral masculino portador de los explantes iniciales. Cuando se emplearon flores masculinas inmaduras procedentes de los brotes florales masculinos más jóvenes (0 y 10 cm de longitud del raquis) se obtuvo una mayor frecuencia de callos de tipo II y III. Sin embargo, cuando las flores masculinas inmaduras se extrajeron de brotes florales masculinos con mayor edad ontogénica (20 y 30 cm de longitud del raquis) disminuyó la frecuencia de aparición de los callos con masas de proembriones y embriones somáticos translúcidos en etapas tempranas de desarrollo ontogénico (tipo III) (Figura 6).

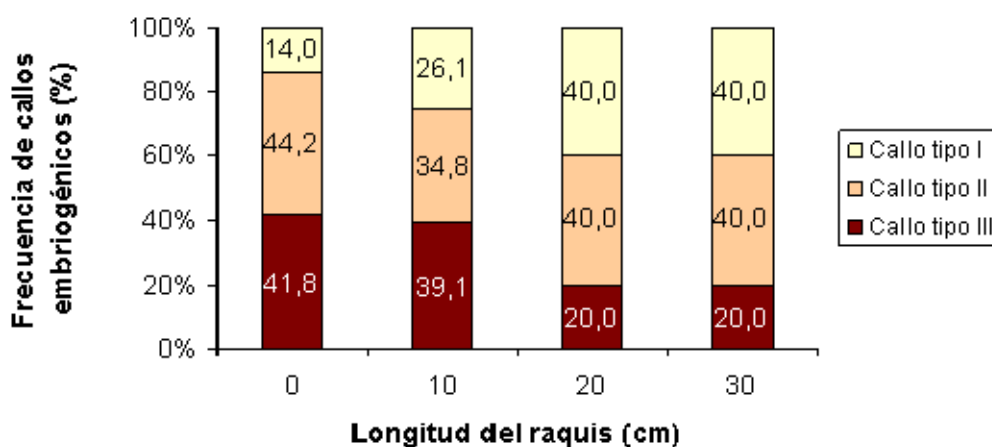
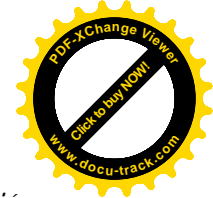
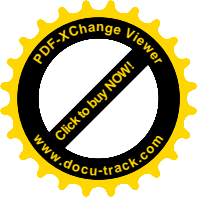


Figura 6. Frecuencia de aparición de callos con estructuras embriogénicas del cv. de plátano ‘FHIA-21’ (*Musa AAAB*) a las 20 semanas de cultivo, procedentes de brotes masculinos con diferentes longitudes del raquis. (I) Callos con menos de 150 mg de masa fresca (MF) de estructuras embriogénicas con embriones somáticos en pequeños grupos aislados. (II) Callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas con embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo ontogénico. (III) Callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas con masa de proembriones y embriones somáticos en etapas tempranas de desarrollo ontogénico.

Con esta investigación, se demostró que la formación de callos con estructuras embriogénicas y la frecuencia de aparición de cada tipo de callo presentan estrecha relación con el estado juvenil del brote floral masculino del cv. de plátano ‘FHIA-21’. De acuerdo con el criterio de Gahan y George (2008), los explantes de tejidos jóvenes forman callos con más facilidad.

Aunque, en plátanos y bananos, las flores masculinas y femeninas inmaduras se han convertido en los explantes más utilizado para la formación de callos con estructuras embriogénicas (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 2000; Kosky *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2010), el bajo porcentaje de formación de estos sigue siendo uno de los principales obstáculos para el proceso de embriogénesis somática en las musáceas.

Las investigaciones científicas se han dirigido principalmente a determinar la concentración óptima de 2,4-D en el medio de cultivo para la formación de callos con



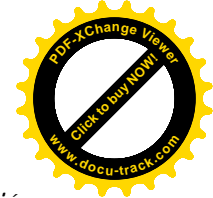
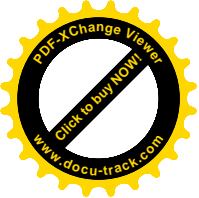
estructuras embriogénicas y se han obviado aspectos como la selección del explante inicial y las características de los callos con estructuras embriogénicas.

Por ejemplo, Escalant *et al.* (1994) lograron una mejor respuesta embriogénica a partir flores masculinas inmaduras del cv. 'Grande Naine' (*Musa* AAA) cuando utilizaron una concentración de $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D; pero esta no fue superior al 5,0%. Sin embargo, Grapin *et al.* (2000) con esta misma concentración señalaron valores de 1,9% y 2,9% en dos cultivares de plátano vianda 'Curaré Enano' (AAB) y 'Curaré' (AAB) respectivamente, con el empleo de flores femeninas como explante inicial.

En el cv. de plátano 'FHIA-21', Daniels *et al.* (2002) también estudiaron el efecto de la concentración de 2,4-D y la posición de las flores masculinas en el eje floral (eligiendo el meristemo floral como posición 0) sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas. Estos autores lograron una respuesta embriogénica de 6,52% con $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D a partir de flores masculinas situadas en la posición 5-9 y observaron una menor formación de callos con estructuras embriogénicas en las flores masculinas más diferenciadas (10-14).

En este estudio, con el empleo de $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D y flores masculinas de la posición cinco a la 14 se obtuvo entre 1,63 y 8,77% de callos con estructuras embriogénicas, según la edad del brote masculino. Al respecto, Youssef *et al.* (2010) sugieren que la respuesta embriogénica de flores masculinas de 'Williams' (*Musa* AAA) y 'Grande Naine' (*Musa* AAA) son atribuibles al estado juvenil del brote masculino y al genotipo, y no a los efectos derivados de la posición de las flores masculinas en el eje floral.

La heterogeneidad en la composición de las estructuras embriogénicas sobre los callos de cultivares de *Musa* ha sido descrita por otros autores. Por ejemplo, Jalil *et al.* (2008) a partir de flores masculinas del cv. 'Mas' (*Musa acuminata* AA) y Strosse *et al.* (2006) a partir de meristemos múltiples (*scalps*).



Los resultados de este experimento demostraron la necesidad de tener en cuenta la posición del brote floral masculino para la formación de callos con estructuras embriogénicas. Las flores masculinas inmaduras procedentes de brotes florales masculinos jóvenes originaron mayor número de callos con estructuras embriogénicas con más de 150 mgMF (tipo II y III). Estos fueron utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas.

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

Los resultados mostraron que el mayor volumen de agregados celulares sedimentados se logró a partir de callos con estructuras embriogénicas en etapas tempranas de desarrollo ontogénico (tipo III). Esta respuesta se observó a las 4, 8, 12 y 16 semanas de cultivo durante la fase de establecimiento de las suspensiones celulares, con diferencias significativas respecto a los callos de tipo II compuestos por embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del tipo de callo con estructuras embriogénicas sobre el volumen de agregados celulares embriogénicos sedimentados (mL) durante el establecimiento de suspensiones celulares del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*).

Tipo de callo con estructuras embriogénicas	Volumen de agregados celulares embriogénicos sedimentados (mL)			
	4 semanas	8 semanas	12 semanas	16 semanas
II	0,32±0,02 b	0,76±0,03 b	1,55±0,03 b	2,32±0,2 a
III	0,67±0,03 a	1,67±0,04 a	3,67±0,04 a	5,98±0,03 a

Medias con letras distintas en una columna difieren significativamente según la prueba T-Student para $p \leq 0,05$. ($n=10$)

(II) Callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas con embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo ontogénico. (III) Callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas con masa de proembriones y embriones somáticos en etapas tempranas de desarrollo ontogénico.

Acorde a los estudios histológicos realizados por Navarro *et al.* (1997) en cultivares de Cavendish, los callos compuestos por masas de proembriones y embriones somáticos en etapa globular se caracterizan por la presencia de células proembriónicas. Estas características pudieran ser la causa de la elevada liberación de agregados celulares embriónicos, de los callos de tipo III, al medio de cultivo líquido.

Las suspensiones celulares embriónicas obtenidas a partir de ambos tipos de callos mostraron similares características. A las cuatro semanas de cultivo presentaron una composición muy heterogénea constituida por células aisladas y pequeños agregados celulares embriónicos. En menor cuantía se observaron células parenquimatosas. Los agregados celulares embriónicos mostraron una forma irregular, algunos de apariencia translúcida y otros no translúcidos (compactos) formados por gran número de células embriónicas en activa división (Figura 7 A).

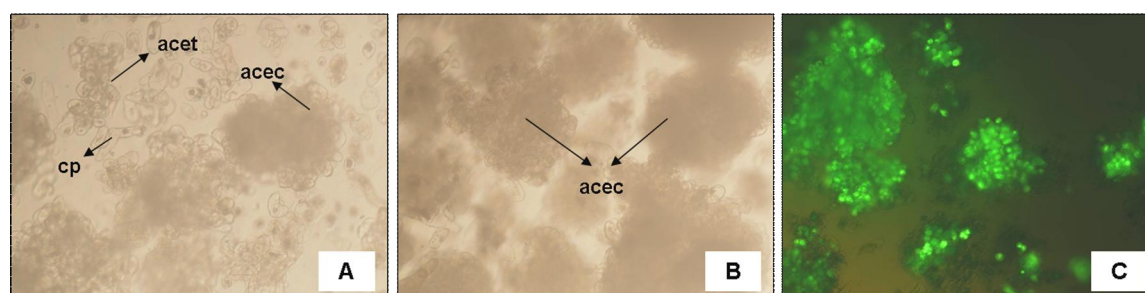
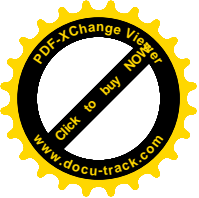
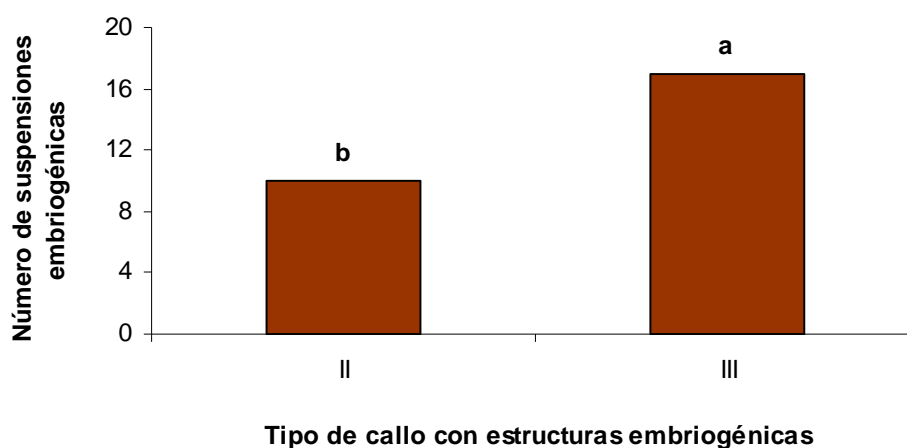


Figura 7. Características de las suspensiones celulares embriónicas del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) a partir de callos tipo III. (A) Agregados celulares embriónicos a las cuatro semanas de cultivo: translúcidos (*acet*) y células parenquimatosas (*cp*), (B, C) Agregados celulares embriónicos compactos (*acec*) mostrando fluorescencia con el uso de diacetato de fluoresceína, a las 16 semanas de cultivo.

A las 16 semanas, se evidenció un predominio de agregados celulares embriónicos compactos (Figura 7 B) en las suspensiones celulares establecidas a partir de ambos tipos de callos. Estos agregados embriónicos mostraron una elevada vitalidad (Figura 7 C) con valores que oscilaron entre 87,0 y 95,0% y su diámetro varió entre 80-400 μm después del tamizado con filtros de malla metálica de 500 μm de diámetro del poro.



A los 6 meses de cultivo, el mayor número de suspensiones celulares embriogénicas establecidas se cuantificó a partir de los callos de tipo III, con diferencias significativas respecto a los callos de tipo II (Figura 8). Estas suspensiones se caracterizaron por presentar agregados de celulares embriogénicos con rápida sedimentación (un minuto), viabilidad superior al 80,0% y una tasa de multiplicación entre 1,5 y 2,0 ml de volumen de células sedimentadas en dos semanas de cultivo, según los criterios de selección establecidos por Strosse *et al.* (2003).

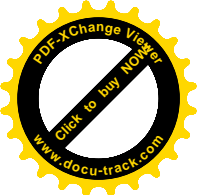


Barras con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba Mann-Whitney para $p \leq 0,05$. ($n=10$)

Figura 8. Efecto del tipo de callo con estructuras embriogénicas sobre el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), a los 6 meses de cultivo.

(II) Callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas con embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo ontogénico. (III) Callos con más de 150 mgMF de estructuras embriogénicas con masa de proembriones y embriones somáticos en etapas tempranas de desarrollo ontogénico.

La caracterización celular del establecimiento de suspensiones de células embriogénicas en las musáceas, ha sido descrita por diferentes autores. Por ejemplo, Grapin *et al.* (1996), en el cultivar 'French Sombre' (*Musa AAB*) colocaron callos con estructuras embriogénicas, en medio de cultivo líquido y establecieron suspensiones celulares heterogéneas constituidas por agregados celulares, proembriones, nódulos y células

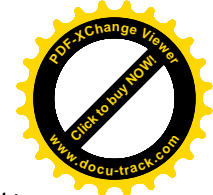
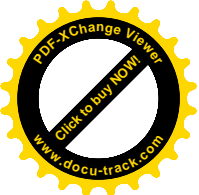


aisladas. Por su parte, Escalant *et al.* (1994) y Côte *et al.* (1996), establecieron suspensiones celulares a partir de callos obtenidos de flores masculinas de banano cv. 'Grande Naine' (*Musa AAA*), compuestas por gran cantidad de agregados celulares y proembriones.

En el cv 'FHIA-21', Daniels *et al.* (2002) no encontrando diferencias significativas entre diferentes concentraciones de 2,4-D utilizadas para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas, lo cual indica que esta auxina no determinó el establecimiento de las suspensiones. Según Strosse *et al.* (2003), la calidad de la suspensión celular va a depender de las características de las estructuras embriogénicas del callo y del rigor con que se maneje el establecimiento del cultivo en medio de cultivo líquido.

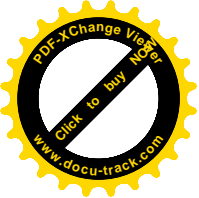
Posteriormente, Strosse *et al.* (2006) formaron callos a partir de meristemos múltiples (*scalps*) y señalaron que el callo compuesto por proembriones y embriones en etapa globular resultó ideal para el establecimiento de una suspensión de células embriogénicas. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio. Sin embargo, es de destacar que en el cv. 'FHIA-21' ambos tipos de callos liberaron agregados de células al medio de cultivo y se logró formar un 50,0% de suspensiones celulares embriogénicas a partir de callos de tipo II compuestos por embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo, lo cual no fue descrito por Strosse *et al.* (2006).

Los resultados indicaron que el tipo de callo con estructuras embriogénicas influyó en el proceso de establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas. A partir de los callos con masas de proembriones y embriones somáticos en etapas tempranas de desarrollo ontogénico (tipo III) se observó el mayor volumen de agregados celulares sedimentados y el mayor porcentaje de suspensiones celulares embriogénicas (85,0%). Sin embargo, las suspensiones celulares embriogénicas obtenidas a partir de ambos tipos de callos (tipo II y tipo III) mostraron similares características, por lo que pudieran ser



utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cv. de plátano 'FHIA-21'.

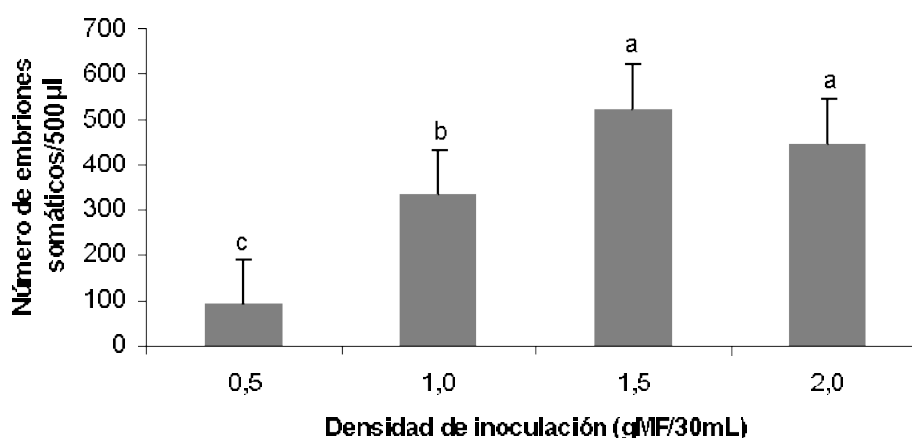
Con este experimento se demostró que la selección del explante inicial juega un papel importante en el comienzo del proceso de embriogénesis somática en el cv. de plátano 'FHIA-21'. En este sentido, las flores masculinas inmaduras procedentes de los brotes florales masculinos más jóvenes presentaron mayor formación de callos con estructuras embriogénicas. Por su parte, la caracterización morfológica de los callos con estructuras embriogénicas y la determinación de su frecuencia de aparición fueron especialmente importantes para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas. La identificación de los explantes adecuados para aumentar el porcentaje de callos con estructuras embriogénicas y su efecto en el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas constituyó el primer paso en el éxito de la propagación *in vitro* del cv. 'FHIA-21' por embriogénesis somática.



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

4.2.1 Formación de embriones somáticos

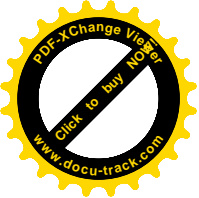
Los resultados mostraron la formación de embriones somáticos a partir de los agregados celulares embriogénicos en las cuatro densidades de inoculación ensayadas. Sin embargo, con 1,5 y 2,0 gMF/30mL se obtuvieron los mayores valores en el número de embriones somáticos con 524,0 y 447,5, respectivamente. Entre ambas densidades no hubo diferencias significativas y sí con los valores obtenidos en las densidades de 0,5 y 1,0 gMF/30mL (Figura 9).



Barras con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba Dunnett C, para $p \leq 0,05$ ($n=20$).

Figura 9. Efecto de la densidad de inoculación sobre el número de embriones somáticos formados en el cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), a los 30 días en medio de cultivo líquido.

La densidad de inoculación inicial es un factor importante en la formación de embriones somáticos cuando las células embriogénicas se cultivan en medio de cultivo líquido (Osuga *et al.*, 1993; Higashi *et al.*, 1999). Los resultados de estos autores evidencian que existe un efecto de autoinhibición del proceso embriogénico, que está ligado a las



elevadas densidades de inoculación, de manera que la densidad celular puede estimular o reprimir la formación de los embriones. Además de influir en la respuesta asincrónica de los embriones somáticos.

Una alta densidad de agregados celulares embriogénicos inhibió la formación de embriones somáticos de zanahoria (Kobayashi *et al.*, 2001). La inhibición puede estar relacionada con la secreción de proteínas (de Vries *et al.*, 1988; McCabe *et al.*, 1997) y otros compuestos por las células, los cuales se acumulan en el medio de cultivo (Kobayashi *et al.*, 2000).

En *Musa* spp., los resultados del presente trabajo corroboran los descritos por autores como Cabrera *et al.* (2002) y Barranco *et al.* (2009) en relación con el efecto de la densidad de inoculación y el genotipo en la formación de embriones somáticos, en medio de cultivo líquido. Por ejemplo, Cabrera *et al.* (2002) obtuvieron la mayor formación de embriones somáticos del cv. de plátano 'Navolean' (*Musa* ABB) con 1,2 gMF (30mL de medio de cultivo) de densidad de inoculación, mientras que Barranco *et al.* (2009) alcanzaron el mayor número de embriones somáticos en el cv. de banano 'FHIA-18' cuando utilizaron una densidad de 1,0 gMF (30mL de medio de cultivo).

Igualmente, los resultados de Dai *et al.* (2010) demostraron que para la formación de embriones del cv. 'Da Jiao' (*Musa paradisiaca* ABB Linn.) el factor densidad de inoculación fue determinante y además, independiente del tamaño de los agregados celulares embriogénicos.

4.2.1.1 Morfología e histología de los embriones somáticos

En este estudio, los resultados revelaron que la densidad de inoculación no solo influyó en el número de embriones somáticos, sino también sobre su morfología. En las cuatro densidades de inoculación que se ensayaron, el desarrollo de los agregados celulares embriogénico no mostró diferencias durante los primeros 15 días de cultivo. En ese

momento se observó la formación en su periferia de proembriones, los que progresivamente se organizaron y dieron lugar a numerosas zonas embrionarias (Figura 10). Sin embargo, al finalizar el período de cultivo (30 días) se apreciaron diferencias en la apariencia y longitud de los embriones somáticos.

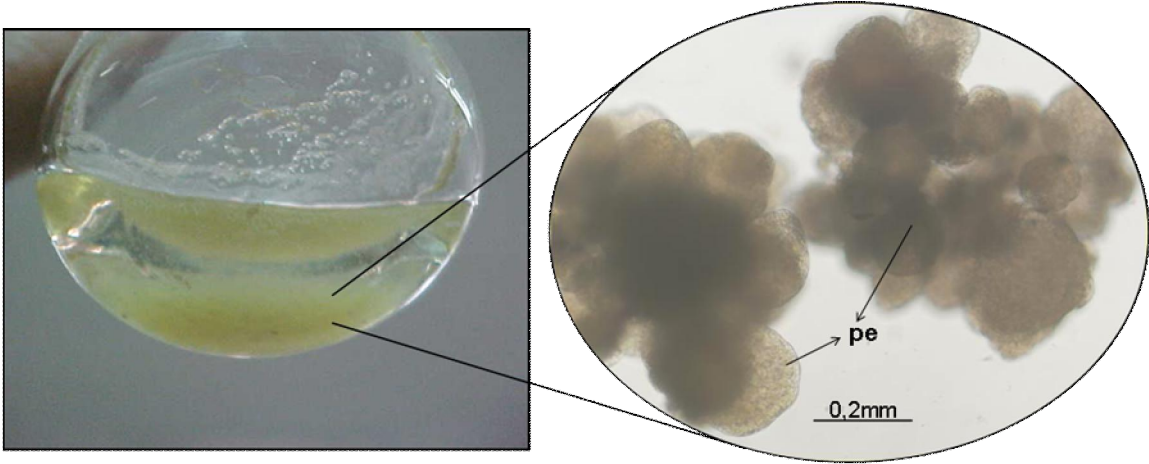


Figura 10. Suspensión de células y agregados celulares embriogénicos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) con formación de proembriones (*pe*), a los 15 días de cultivo (barra=0,2mm) (250x).

Los embriones somáticos obtenidos con 1,5 gMF/30mL de densidad de inoculación mostraron una coloración amarilla y permanecieron agrupados (Figura 11 A). Las secciones histológicas evidenciaron estructuras anatómicas de la etapa globular, tales como la definición de la protodermis y la presencia de células meristemáticas. Además, al examinar los cortes histológicos se encontraron sustancias de reserva en las células centrales cercana a la base del embrión (Figura 11 B, C).

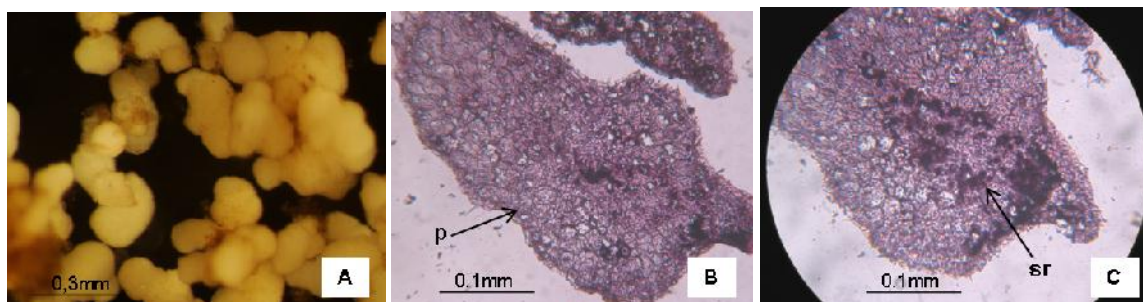


Figura 11. (A) Embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) formados con 1,5 gMF/30mL de densidad de inoculación, a los 30 días de cultivo (barra=0,3mm) (250x). (B, C) Secciones histológicas del embrión con presencia de protodermis (*p*) y sustancias de reserva (*sr*) (barra=0,1mm) (400x).

El mayor porcentaje de los embriones somáticos formados con 1,5 gMF/30mL (86,4%) presentaron una longitud de 0,26 a 0,50mm y se ubicaron en uno de los rangos establecidos. Con esta densidad de inoculación se observó, por tanto, una mayor sincronización en cuanto al desarrollo morfológico de los embriones somáticos, con respecto al resto de los tratamientos (Figura 12).

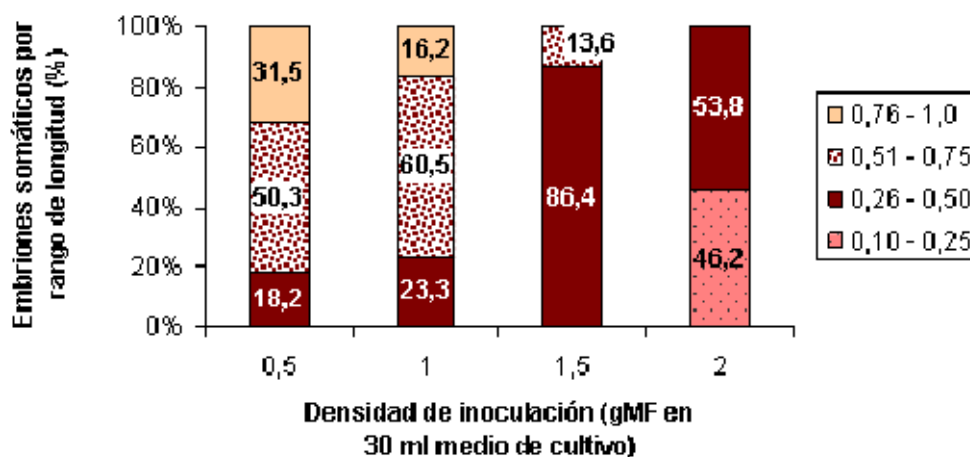


Figura 12. Porcentaje de embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) formados con diferentes densidades de inoculación, según el rango de longitud (0,10 a 0,25; 0,26 a 0,50; 0,51 a 0,75; 0,76 a 1,00mm)

Los embriones somáticos obtenidos con 2,0 gMF/30mL presentaron una longitud que se extendió a dos de los rangos establecidos. El 53,8% se encontraban en el rango de 0,26 a 0,50 mm, permanecieron agregados y mostraron similares características histológicas que los embriones formados con 1,5 gMF/30mL. Los embriones somáticos restantes (46,2%) fueron los de menor longitud y se ubicaron en el rango de 0,10 a 0,25mm (Figura 12).

Por otra parte, los embriones somáticos formados con 0,5 y 1,0 gMF/30mL presentaron alta heterogeneidad en su longitud, la cual abarcó tres de los rangos establecidos, con un mayor porcentaje en de 0,51 a 0,75mm (Figura 12). Estos embriones no se encontraban agrupados y se observó, en algunos, la presencia en su base de embriones secundarios en etapa globular (Figura 13 A). En las secciones histológicas se identificó la formación de bandas procambiales en la región central del embrión. Estas estructuras son propias en embriones somáticos de avanzado desarrollo ontogenético (Figura 13 B).

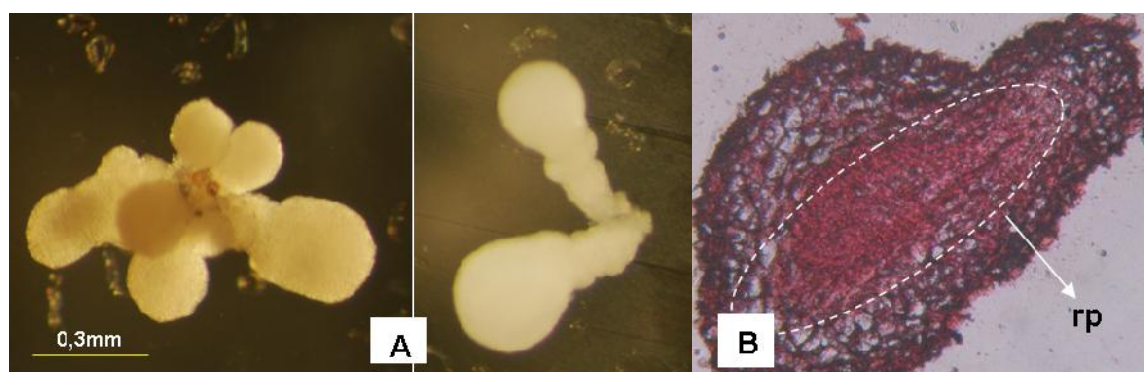
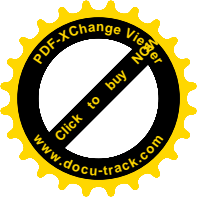


Figura 13. (A) Embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) formados con 0,5 gMF/30mL de densidad de inoculación, en 30 mL de medio de cultivo líquido (250x). (B) Sección histológica del embrión mostrando la región procambial *rp* (400x).

Los resultados indicaron que la densidad de inoculación influyó sobre la sincronización del proceso de embriogénesis somática. La selección adecuada de la densidad contribuyó a la reducción de la asincronía, aspecto fundamental para el empleo de la embriogénesis somática en la propagación masiva o comercial. La sincronización del proceso evitaría las operaciones de selección de embriones para su posterior maduración, geminación y



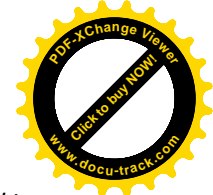
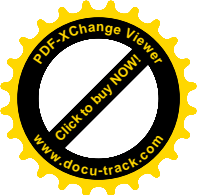
conversión de las plantas en condiciones *ex vitro* (Tonon *et al.*, 2001; Barry-Etienne *et al.*, 2002). Según Gupta y Timmis (2005), estas operaciones complicarían los protocolos e incrementarían sustancialmente los costos de producción.

En la literatura científica se ha descrito el carácter asincrónico del proceso de embriogénesis somática, dado por la presencia de embriones en diferentes etapas de desarrollo ontogénico (Celestino *et al.*, 2005). En las musáceas es difícil identificar estas etapas (globular, escutelar y coleoptilar) porque no se distinguen grandes cambios morfológicos, como ocurre en las especies dicotiledóneas. Hasta el momento no se conoce de estudios que refieran evaluaciones sobre la asincronía del proceso de formación de los embriones somáticos en *Musa* spp.

Los estudios histológicos en musáceas se han limitado a establecer diferencias entre callos embriogénicos y no embriogénicos (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 1996; Grapin *et al.*, 1998). Aunque, Georget *et al.* (2000) realizaron una descripción histológica de embriones somáticos del cv. 'Grande Naine' (*Musa* AAA) formados en medio de cultivo semisólido. De manera similar, estos autores observaron una definición de la protodermis y un enriquecimiento de almidón vacuolar en las células de los embriones somáticos.

En este trabajo, a través de la medición de la longitud de los embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' y su análisis histológico, se pudo corroborar el carácter asincrónico del proceso y demostrar por primera vez en *Musa* el efecto de la densidad inoculación sobre el desarrollo morfológico de los embriones en medio de cultivo líquido.

En especies de plantas dicotiledóneas, varios autores coinciden en señalar que la densidad de inoculación es un factor importante en el desarrollo del proceso de embriogénesis somática, en medio de cultivo líquido. Por ejemplo, en el cultivo del café (*Coffea arabica* L.) con una alta densidad de inoculación se produjo la mayor formación de embriones somáticos en etapa globular, mientras que el cultivo con baja densidad



desencadenó la presencia de embriones somáticos en etapas avanzadas de desarrollo ontogénico (torpedo y cotiledonal) (Barbón-Rodríguez *et al.*, 2003; de Feria *et al.*, 2005; Ducos *et al.*, 2007).

4.2.1.2 Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo

En los primeros tres días de cultivo se observó un incremento en el contenido de nutrientes minerales, con excepción del manganeso. El contenido de calcio se incrementó de manera continua hasta los seis días de cultivo. Posteriormente, se inició una disminución progresiva de todos los nutrientes minerales hasta los 30 días en que finalizó el período de cultivo. No obstante, la evaluación realizada a los 18 días, reveló un aumento del contenido de nutrientes minerales, lo cual pudo estar asociado a la renovación del 50,0% del medio de cultivo efectuado a los 15 días (Figura 14).

El incremento del contenido de los elementos minerales durante los primeros tres días de cultivo puede deberse a la liberación de componentes celulares por la lisis de algunas células. Entre las causas que ocasionan lisis celular se encuentra el estrés de las células y los agregados celulares durante el proceso de inoculación y la posterior adaptación a las nuevas condiciones de cultivo (Strosse *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2006). También puede tener su explicación en el intercambio iónico que se produce durante los primeros días de cultivo, el cual ha sido observado principalmente con cationes como el calcio, potasio y el magnesio (George y de Klerk, 2008).

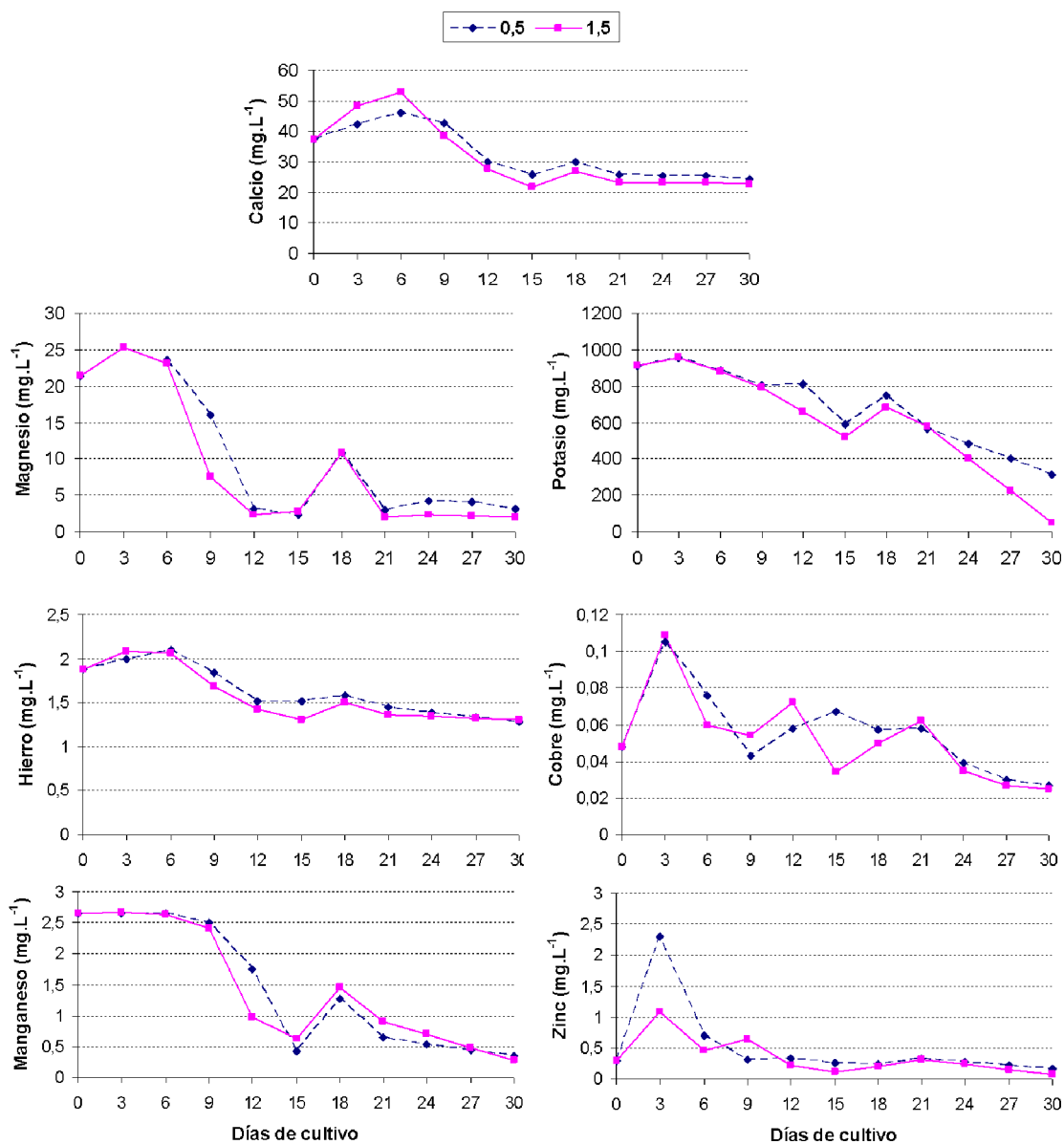
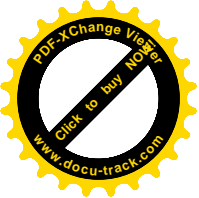


Figura 14. Efecto de la densidad de inoculación sobre el contenido de calcio, magnesio, potasio, hierro, cobre, manganeso y zinc en el medio de cultivo durante la formación de los embriones somáticos del cv. 'FHIA-21' (*Musa AAAB*).

Los resultados de George y de Klerk (2008) mostraron que estos cationes son atraídos por las cargas negativas de la membrana celular y se produce un intercambio a nivel de pared celular. Estos autores señalaron cómo disminuye la concentración mineral en los



tejidos de las plantas durante los primeros dos días del cultivo *in vitro*, para posteriormente activarse la absorción celular.

Cabe destacar, que independientemente de que ambas densidades de inoculación mostraron similar tendencia en el tiempo, a los 30 días de cultivo se encontró un menor contenido de calcio, magnesio, potasio y zinc en el medio de cultivo con 1,5 gMF/30mL en comparación a 0,5 gMF/30mL, con diferencias significativas entre estas. Sin embargo, ambas densidades no difirieron significativamente en el contenido de hierro, cobre y manganeso en el medio de cultivo (Tabla 5).

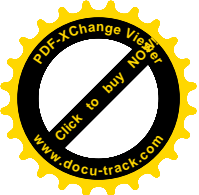
Tabla 5. Efecto de la densidad de inoculación sobre el contenido final de nutrientes minerales en el medio de cultivo de formación de embriones somáticos del cv. 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), a los 30 días de cultivo.

Nutriente mineral	Densidad de inoculación				
	0,5 gMF/30mL			1,5 gMF/30mL	
	Inicial (mg. L ⁻¹)	Final (mg.L ⁻¹)	(%)	Final (mg.L ⁻¹)	(%)
Calcio	37,4	24,5 a	65,50	22,7 b	60,69
Magnesio	21,4	3,2 a	14,95	2,0 b	9,34
Potasio	913,3	316,9 a	34,69	48,3 b	5,28
Hierro	1,880	1,284 a	68,29	1,302 a	69,25
Cobre	0,048	0,027 a	56,25	0,025 a	52,08
Manganeso	2,656	0,346 a	13,02	0,269 a	10,10
Zinc	0,286	0,159 a	55,5	0,068 b	23,77

Leyenda: % Porcentaje del contenido final respecto al contenido inicial
Medias con letras distintas en una misma fila difieren significativamente según la prueba Mann Whitney para $p \leq 0,05$ ($n=5$).

En bananos y plátanos, no se han informado estudios científicos que relacionen la densidad de inoculación con el contenido de nutrientes minerales del medio de cultivo en el proceso de embriogénesis somática.

En el presente trabajo evidenció la importancia de los diferentes nutrientes minerales en el proceso de embriogénesis somática del cv. de plátano 'FHIA-21', lo cual no ha sido

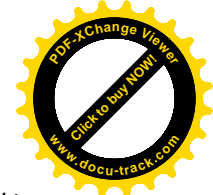
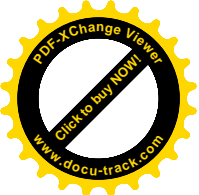


referido hasta el momento en el género *Musa*. Lo anterior se fundamentó en la reducción del contenido de calcio, magnesio, potasio y zinc en el medio de cultivo con 1,5 gMF/30mL de densidad de inoculación, respecto al contenido mostrado con 0,5 gMF/30mL.

En otras especies de plantas, se ha descrito el papel significativo del calcio, magnesio, potasio y zinc en el proceso de embriogénesis somática. Por ejemplo, la participación del calcio en la embriogénesis somática de zanahoria (*Daucus carota* L.) fue demostrado por Takeda *et al.* (2003) al obtener mayor número de embriones somáticos cuando los explantes fueron colocados directamente en medio de cultivo que contenía calcio, respecto a los transferidos después de siete días. Estos autores demostraron que el aumento del calcio libre en el citoplasma coincidía con la inducción del proceso de embriogénesis somática.

Por otra parte, los resultados de Mahalakshmi *et al.* (2007) corroboraron una relación entre la presencia de calcio y la acción del 2,4-D en la inducción de la respuesta embriogénica, en hojas de trigo (*Triticum aestivum* var. HD 2329). Ellos observaron una reducción del 80,0% de la formación de embriones somáticos cuando el calcio no se adicionó al medio de cultivo.

Posteriormente, Ghasemi *et al.* (2009) señalaron que el calcio tuvo un efecto significativo en el proceso de diferenciación de los embriones somáticos de zanahoria (*Dacus carota* L. cv. Nants). El incremento del calcio hasta 1,0 mM en el medio de cultivo aumentó el número de embriones en etapa globular, mientras que los embriones en etapa cotiledonal fueron observados en la mayor concentración de este nutriente mineral. Estos resultados mostraron que el calcio tiene un efecto directo sobre el embrión somático. Según Mashayekhi (2007), un exceso en la entrada de calcio en las células hace que se



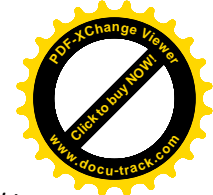
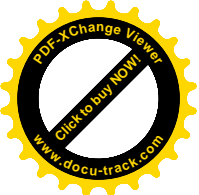
produzca un potencial eléctrico por su acumulación en la pared celular y la membrana de la vacuola, el cual incrementa la polaridad celular y estimula la diferenciación celular.

En el caso del magnesio, existen evidencias que la omisión de este mineral en el medio de cultivo redujo el número de embriones somáticos en callos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Walker y Sato 1981). También en el cultivo de melón (*Cucumis melo* L.), Kintzios *et al.* (2004) observaron con la mayor concentración de magnesio la formación directa de embriones somáticos, mientras que con la menor concentración solamente ocurrió la formación de callos.

Otros autores, como Desai *et al.* (2006), le atribuyeron una función importante al magnesio por su alta acumulación en los tejidos durante el desarrollo de las diferentes fases de la embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Estos autores encontraron la mayor acumulación de magnesio en callos proembriogénicos, o sea al iniciarse la formación de los embriones somáticos. Por su parte, Minyaka *et al.* (2008) en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) observaron el efecto positivo del magnesio y el potasio en la adquisición de competencia embriogénica de siete genotipos considerados recalcitrantes. Todos estos genotipos fueron capaces de producir embriones somáticos dependiendo de la concentración de $MgSO_4$ y K_2SO_4 en el medio de cultivo.

Mondal *et al.* (2001), en el cultivo del té (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) informan la importancia del potasio en la sincronización de la embriogénesis somática. Estos resultados apoyan los encontrados en el presente trabajo ya que con la densidad inoculación de 1,5 gMF/30mL se obtuvo mayor sincronización en el desarrollo morfológico de los embriones somáticos unido a un alto consumo de potasio (Figura 12 y Tabla 5).

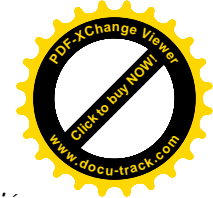
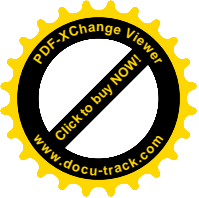
Por otra parte, los resultados de Hossain *et al.* (1997) indicaron que el zinc aumenta la actividad de las auxinas por el incremento en el crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de arroz (*Oriza sativa* L.). El efecto beneficioso de este mineral fue también



descrito por Echavarrí *et al.* (2008), los cuales observaron un aumento (40,0-53,0%) del número de embriones somáticos en diferentes cultivares de cebada (*Hordeum vulgare* L.). Adicionalmente, los resultados de Helmersson *et al.* (2008) han puesto de manifiesto que el zinc es un potente regulador de la muerte celular programada y es crucial para la modelación embriogénica de las plantas.

Más recientemente, en una especie de planta medicinal (*Plantago ovata* Forssk), Saha *et al.* (2010) observaron una mayor acumulación de potasio, calcio, magnesio, cobre y zinc en la fase de formación de embriones somáticos en comparación con otras etapas, lo cual sugiere que estos elementos son cruciales para el éxito de la embriogénesis somática.

Los resultados, de esta investigación, mostraron el efecto regulatorio de la densidad de inoculación sobre la formación y desarrollo ontogénico de los embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21'. La medición de la longitud y el análisis de las secciones histológicas permitieron dilucidar la etapa de desarrollo en que se encontraba el embrión y contribuyeron a la selección adecuada de la densidad de inoculación para lograr mayor sincronización del proceso. A partir de estos resultados, se seleccionó 1,5 gMF/30mL para la formación de embriones somáticos con un desarrollo morfológico homogéneo, más del 86,0% en etapa globular con una longitud de 0,26 a 0,50mm. La sincronización durante la formación y desarrollo de los embriones somáticos aumentará la eficiencia del proceso de embriogénesis somática para su uso en la propagación masiva o el mejoramiento genético de este cultivar. Lo anterior se correspondió con una reducción en el contenido de nutrientes minerales del medio de cultivo y se destacó el papel del calcio, magnesio, potasio y zinc en la formación de embriones somático y del potasio en la sincronización de su desarrollo.



4.2.2 Maduración de embriones somáticos

En la fase de maduración los embriones somáticos continuaron su desarrollo ontogénico y los resultados experimentales mostraron la influencia de la densidad de inoculación en su morfología y sincronización del proceso embriogénico.

4.2.2.1 Morfología e histología de los embriones somáticos

Los embriones somáticos que se formaron con 1,5 gMF/30mL de densidad de inoculación mostraron un incremento en su longitud con respecto a la longitud inicial (datos mostrados en acápite anterior), con valores entre 1,0 y 7,0mm. Teniendo en cuenta estas observaciones se establecieron tres rangos de longitudes (1,0 a 3,0; de 3,1 a 5,0 y de 5,1 a 7,0mm) para determinar la sincronización en el desarrollo de los embriones somáticos en cada tratamiento (Figura 15).

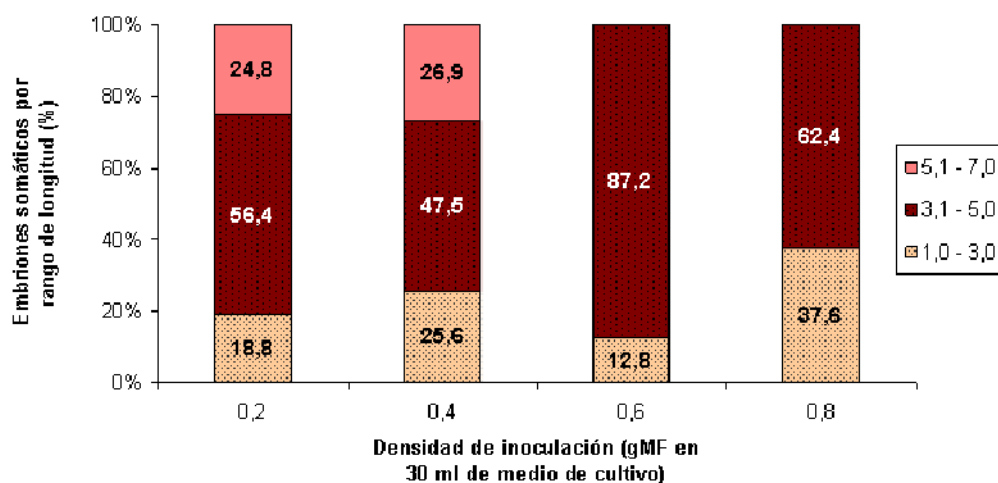


Figura 15. Porcentaje de embriones somáticos del cv. de plátano ‘FHIA-21’ (*Musa AAAB*) según los rangos de longitudes (mm) en diferentes densidades de inoculación, a los 30 días de cultivo en fase de maduración.

Con la densidad de inoculación de 0,6 gMF/30mL se logró una mayor sincronización de la longitud de los embriones somáticos, con respecto al resto de los tratamientos estudiados.

El mayor porcentaje de estos embriones (87,2%) presentaron una longitud de 3,1 a 5,0mm y se ubicaron en uno de los rangos establecidos. Los embriones somáticos cultivados con 0,2 y 0,4 gMF/30mL mostraron mayor heterogeneidad en su longitud, con representación en los tres rangos establecidos (Figura 15).

Los embriones somáticos cultivados con 0,6 gMF/30mL en su mayoría (3,1 a 5,0 mm) se caracterizaron por presentar forma redondeada y una coloración amarillo pálido (Figura 16 A). Las secciones histológicas de estos embriones mostraron una epidermis regular, además de la definición de los meristemas caulinar y radicular. En la región del escutelo se observó la acumulación de sustancias de reservas (Figura 16 B, C, D).

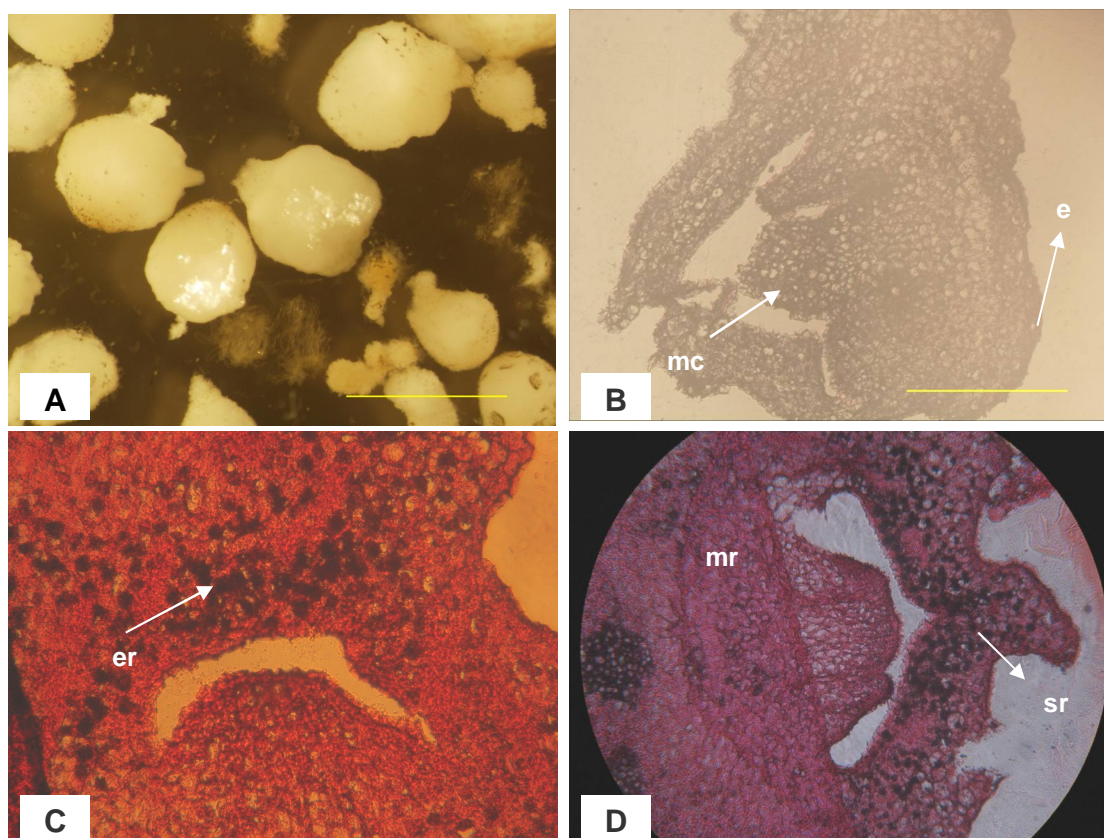


Figura 16. Embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) cultivados con 0,6 gMF/30 mL de medio de cultivo líquido de maduración. (A) Aspecto de los embriones a los 30 días de cultivo (250x) (barra=4,0mm). (B, C, D) Secciones histológicas de los embriones mostrando una epidermis regular (e), meristemo caulinar (mc), sustancias de reserva (sr), meristemo radicular (mr) y escutelo (es) (400x).

Por otra parte, los embriones cultivados con 0,8 gMF/30mL mostraron daño mecánico sobre la epidermis, el cual pudo estar ocasionado por la fricción entre ellos debido a la alta densidad de inoculación (Figura 17 A). Esto pudo ser la causa del oscurecimiento del medio de cultivo como consecuencia de la exudación de compuestos fenólicos y su posterior oxidación.

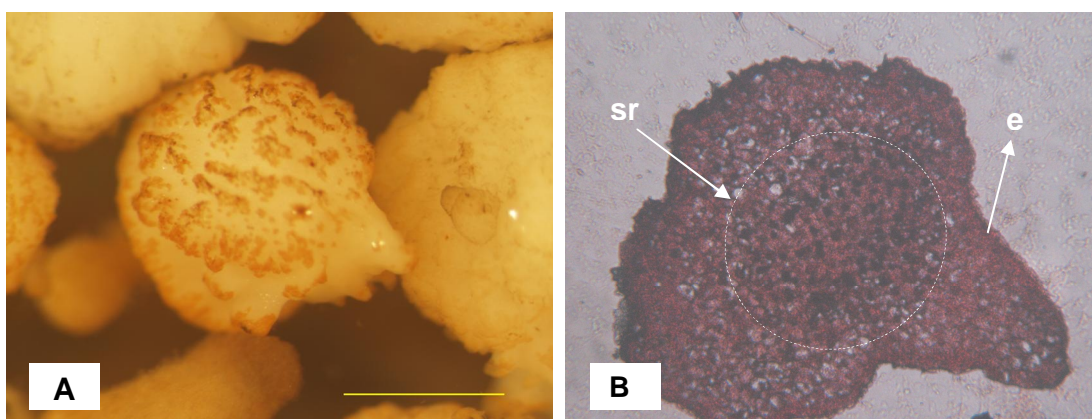


Figura 17. Embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) cultivados con 0,8 gMF/30mL de medio de cultivo líquido de maduración, a los 30 días de cultivo. (A) Embriones somáticos con daño mecánico en la epidermis (250x) (barra=2,5mm). (B) Sección histológica del embrión somático mostrando presencia de estructuras de reserva (sr) y definición de la epidermis (e) (400x).

A los 30 días de cultivo, las secciones histológicas de los embriones somáticos cultivados con 0,8 gMF/30mL evidenciaron la definición de la epidermis y la presencia de sustancias de reserva en el centro del embrión. Sin embargo, no se observó la definición de los meristemas caulinar y radicular (Figura 17 B).

Los embriones cultivados con 0,2 y 0,4 gMF/30mL mostraron germinación parcial, en algunos de ellos, con presencia del primordio caulinar o radicular (Figura 18 A, B). No obstante, en el examen histológico se observó la definición del meristemo caulinar y radicular en la región central del embrión somático. Además de la presencia de una epidermis irregular por la formación de estructuras redondeadas en su periferia y la acumulación de pocas sustancias de reservas en la región del escutelo (Figura 18 C, D).