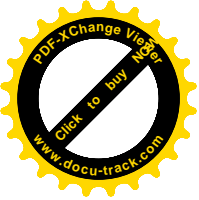


Figura 18. Embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) cultivados con 0,2 gMF en 30 mL de medio de cultivo líquido de maduración (densidad de inoculación), a los 30 días de cultivo. (A, B) Embriones somáticos con germinación parcial del primordio caulinar o radicular (barra=4,0mm) (250x). (C, D) Secciones histológicas con presencia del meristemo caulinar (*mc*), meristemo radicular (*mr*), epidermis irregular (*e*) y escasa presencia de estructuras de reserva (*sr*) (400x).

En el género *Musa*, hasta el momento no se han informado estudios que tengan en cuenta el factor densidad de inoculación sobre la sincronización de los cultivos embriogénicos en fase de maduración. Los resultados de este estudio constituyen el primer informe relacionado con el tema. Además, los trabajos donde se ha estudiado el efecto de la densidad inoculación para la maduración han estimado la culminación del desarrollo morfológico de los embriones somáticos (maduración) solo a través de su germinación (Kosky *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 2002; López, 2006).



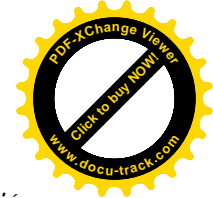
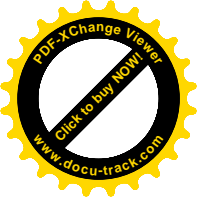
En este sentido, los resultados de Wong *et al.* (2006) constituyen un antecedente al relacionar las características morfológicas e histológicas de los embriones somáticos del cv. de banano 'Mas' (*Musa AA*) con su capacidad de germinación. Como resultado obtuvieron una germinación exitosa en embriones somáticos con definición del meristemo caulinar y radicular, bandas procambiales y gran acumulación de reservas de almidón.

De acuerdo con la información existente, para la maduración de embriones somáticos se requiere de una fase de expansión celular y acumulación de reservas en la célula (Parrot, 1993; Merkle *et al.*, 1995; Jiménez, 2001). En este estudio, se observó la expansión celular a través del incremento en la longitud de los embriones somáticos con respecto a su longitud inicial, la cual se produjo en todos los tratamientos estudiados. Sin embargo, la presencia de sustancias de reservas con la definición de estructuras anatómicas como los meristemos caulinar y radicular, se mostraron solo cuando los embriones fueron cultivados con 0,6 gMF/30mL. Similares estructuras fueron observadas por Grapin *et al.* (2000) en embriones somáticos de tres cultivares de *Musa spp.*

La mayor sincronización en el desarrollo de los embriones durante la fase de maduración se observó con 0,6 gMF/30mL de densidad de inoculación. El 87,2% de los embriones presentaron de 3,1 a 5,0mm de longitud, con formación de los meristemos caulinar y radicular y la acumulación de sustancias de reserva. Estas características se pueden considerar como evidencias de la preparación de los embriones somáticos para la germinación.

4.2.2.2 Determinación de nutrientes minerales en el medio de cultivo

A los 30 días de cultivo, los resultados mostraron mayor contenido de calcio, magnesio, potasio y manganeso cuando los embriones fueron cultivados con 0,6 gMF/30mL en comparación con 0,2 gMF/30mL de densidad de inoculación, con diferencias significativas entre ambas. Al mismo tiempo, se observó que el contenido de cobre y zinc fue



significativamente superior con 0,2 gMF/30mL respecto a la densidad de 0,6 gMF/30mL. Sin embargo, el contenido final de hierro en el medio de cultivo no mostró diferencias significativas entre ambas densidades (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la densidad de inoculación sobre el contenido final de nutrientes minerales en el medio de cultivo de maduración de embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), a los 30 días de cultivo.

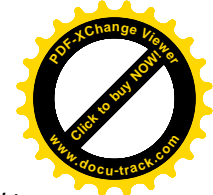
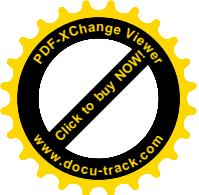
Nutriente mineral	Densidad de inoculación				
	0,2 gMF/30mL			0,6 gMF/30mL	
	Inicial (mg. L ⁻¹)	Final (mg. L ⁻¹)	Final (%)	Final (mg. L ⁻¹)	Final (%)
Calcio	67,4	36,60 b	54,30	73,8 a	109,51
Magnesio	17,3	6,40 b	36,98	14,5 a	83,81
Potasio	625,0	287,24 b	45,95	606,0 a	96,97
Hierro	3,239	1,02 a	31,49	1,090 a	33,65
Cobre	0,068	0,121 a	177,94	0,089 b	130,8
Manganeso	3,244	2,578 b	79,46	4,201 a	129,5
Zinc	1,548	3,049 a	196,96	2,036 b	131,52

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 $p \leq 0,05$ ($n=6$).

El incremento que se produce en el contenido de calcio, cobre, manganeso y zinc con 0,6 gMF/30mL de densidad de inoculación y de cobre y zinc con 0,2 gMF/30mL, al final del cultivo, podría tener explicación en el intercambio iónico que ocurre a nivel de membrana celular, el cual ha sido observado en estos cationes por George y de Klerk (2008).

El hierro fue el nutriente mineral de menor contenido en el medio de cultivo, en ambas densidades de inoculación, lo cual permite deducir que este mineral juega un papel importante en la maduración de los embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21'. Lo anterior pudiera estar relacionado con las numerosas funciones celulares en las que interviene. Por ejemplo, los resultados de Lanquar *et al.* (2005) demostraron a través de la participación de las proteínas transportadoras de metales (AtNRAMP3 y AtNRAMP4), que



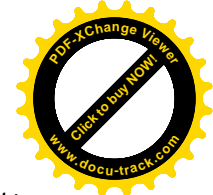
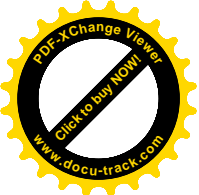
la movilización del hierro vacuolar es esencial durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. En ese momento se produjo alto consumo de energía por la gran actividad respiratoria y se activan las reacciones de oxidación reducción. Según estos autores, la formación de nuevas mitocondrias para el desarrollo de este proceso requiere de la introducción a las células vegetales de gran cantidad de hierro y la observación del número de mitocondrias en los tejidos vegetales les permitió validar esta hipótesis.

En plátanos y bananos no se han descrito resultados que relacionen el contenido de nutrientes minerales y su función en el desarrollo de embriones somáticos. Estos resultados evidenciaron que los elementos minerales no juegan un papel fundamental en la fase de maduración de los embriones somáticos en el cv. 'FHIA-21', lo cual abre nuevas interrogantes sobre los requerimientos nutricionales durante esta fase.

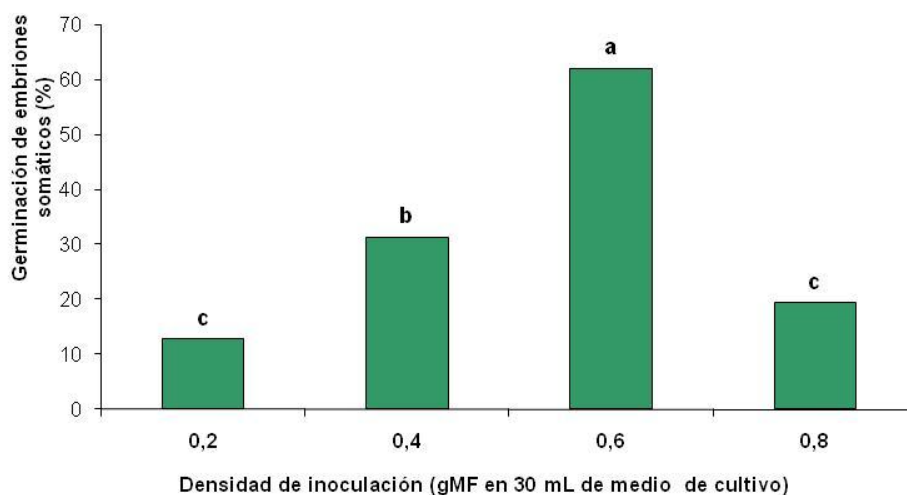
En otras especies de plantas, muchos progresos se han realizado para el desarrollo y calidad del embrión somático con la modificación del contenido mineral del medio de cultivo. Existen evidencias a través de los resultados de Pullman *et al.* (2003) que un aumento del contenido hierro durante la fase de maduración, mejoró el crecimiento y desarrollo de embriones somáticos de pino (*Pinus taeda* L.). Estos autores realizaron un análisis comparativo entre el contenido mineral de los embriones somáticos y cigóticos, el cual indicó que los embriones somáticos contenían tres veces más calcio, 1,8 más de potasio y 17 veces más boro que los embriones cigóticos.

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

Los resultados mostraron la influencia de la densidad de inoculación, utilizada durante la fase de maduración, sobre la germinación de los embriones somáticos del cv. 'FHIA-21'. A los 30 días de cultivo, el mayor porcentaje de germinación correspondió a los embriones



cultivados con 0,6 gMF/30mL (62,0%), con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 19).



Barras con letras distintas indican diferencias significativas según prueba Kruskal Wallis, para $p < 0,05$ ($n=20$)

Figura 19. Efecto de la densidad de inoculación en la fase de maduración sobre el porcentaje de germinación de embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), a los 30 días de cultivo.

Desde el punto de vista morfológico, la germinación de los embriones somáticos se desarrolló de manera diferente en dependencia de la densidad de inoculación. A los 10 días de cultivo, los embriones somáticos cultivados con 0,6 gMF/30mL mostraron una definición del ápice caulinar. A los 20 días se observaron pequeños brotes de color verde, los cuales se elongaron y a los 30 días de cultivo habían dado lugar a plantas completas (Figura 20 A, B, C). Sin embargo, los embriones somáticos cultivados con 0,2 y 0,4 gMF/30mL presentaron incremento del tamaño con un crecimiento irregular de la epidermis, a los 10 días de cultivo (Figura 20 D). Posteriormente, a los 20 días estas irregularidades se convirtieron en estructuras redondeadas de color blanco (Figura 20 E) y a los 30 días se diferenciaron pequeños brotes de color verde a partir de estas estructuras, dando lugar a plantas con malformaciones (Figura 20 F).

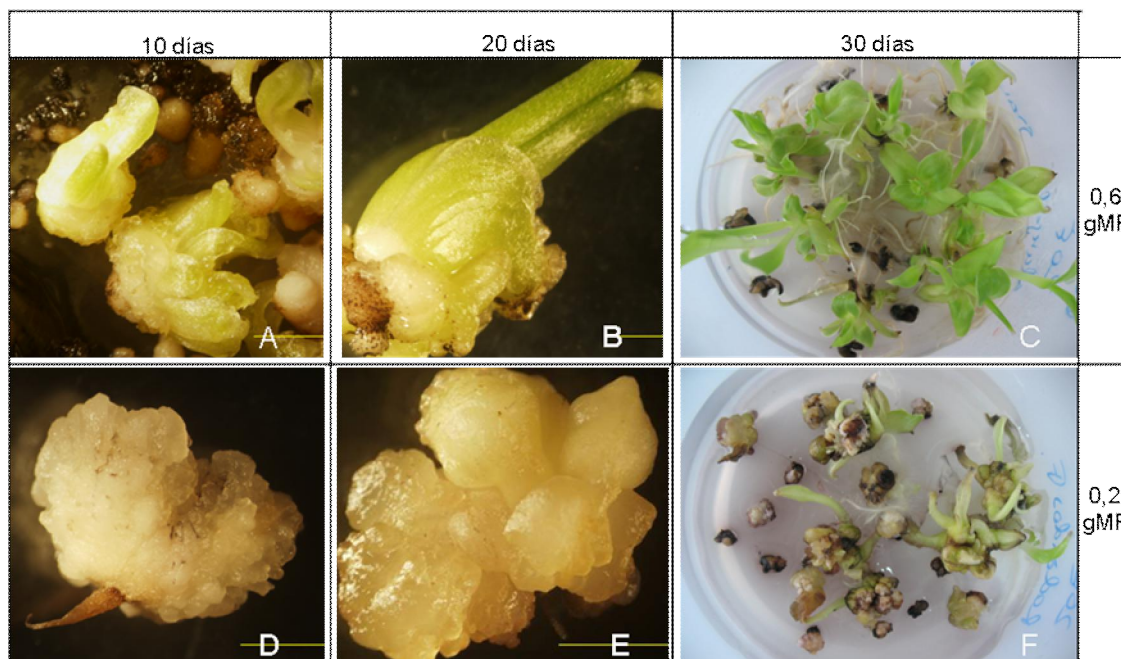


Figura 20. Embriones somáticos germinados del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*) en medio de cultivo semisólido, a los 10, 20 y 30 días de cultivo. (A, B, C). Embriones somáticos cultivados con 0,6 gMF/30mL durante la fase de maduración. (D, E, F) Embriones somáticos cultivados con 0,2 gMF/30mL durante la fase de maduración.

Los embriones somáticos cultivados con 0,8 gMF/30mL durante la fase de germinación mostraron una secuencia de eventos similares a las observadas en los embriones cultivados con 0,6 gMF/30mL. Sin embargo, su bajo porcentaje de germinación (19,3%) se produjo por la fenolización y muerte de los embriones somáticos (Figura 19). Esta respuesta pudo estar dada por el daño mecánico que presentaban en la epidermis y el poco desarrollo ontogénico que alcanzaron al finalizar la fase de maduración, el cual se evidenció en las secciones histológicas del acápite anterior.

Al analizar las características morfológicas de las plantas procedentes de los embriones somáticos se observó, que aquellas provenientes del cultivo con 0,6 gMF/30mL tuvieron mejor definición y longitud del pseudotallo, más de dos hojas abiertas y mayor número de raíces, con diferencias significativas respecto a las plantas procedentes del resto de los tratamientos (Tabla 7, Figura 21 A). Sin embargo, las plantas originadas de embriones

somáticos cultivados con 0,2 y 0,4 gMF/30mL mostraron un crecimiento en forma de roseta, determinado por la no definición de un pseudotallo y con la presencia de múltiples brotes de apariencia adventicia (Figura 21 B).

Tabla 7. Efecto de la densidad de inoculación en la fase de maduración en las características morfológicas de las plantas procedentes de embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), a los 30 días en medio de cultivo de germinación.

Densidad de inoculación (gMF)	Longitud del pseudotallo (cm)		Número de hojas		Número de raíces	
	Medias	Rangos Medios	Medias	Rangos Medios	Medias	Rangos Medios
	0,2	0,29	28,02 c	1,00	34,07 c	2,21
0,4	0,65	51,90 b	1,72	54,56 b	0,40	23,48 c
0,6	1,07	73,33 a	2,46	72,72 a	3,68	71,80 a
0,8	0,64	47,21 b	1,23	40,52 bc	2,11	51,63 b

Rangos medios con letras distintas en una columna difieren significativamente según la prueba Kruskal-Wallis, para $p \leq 0,05$.

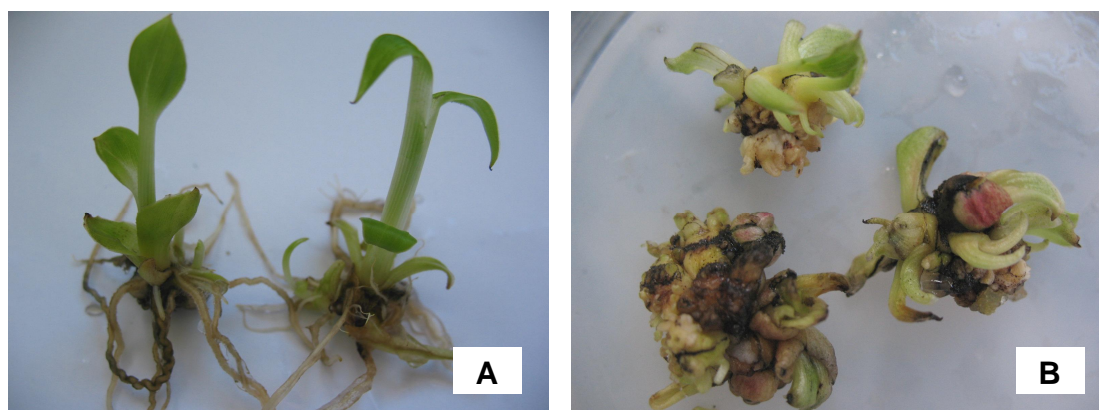
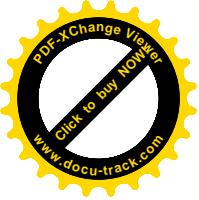


Figura 21. Plantas procedentes de embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), a los 30 días de cultivo. (A) Plantas procedentes de embriones somáticos cultivados con 0,6 gMF/30mL durante la fase de maduración. (B) Plantas con cambios en su morfología procedentes de embriones somáticos cultivados con 0,2 gMF/30mL durante la fase de maduración.

A partir de estos resultados se demostró que 0,6 gMF/30mL de densidad de inoculación permitió un mayor desarrollo morfológico de los embriones somáticos, lo cual facilitó su germinación y formación de plantas completas. Sin embargo, las condiciones de cultivo

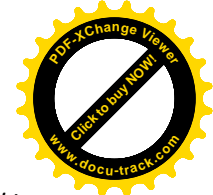
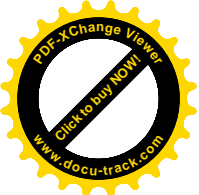


con 0,2 y 0,4 gMF/30mL propiciaron cambios en la morfología de las plantas (Figura 21 B). Esto apoya el hecho de que la densidad de inoculación y el cultivo medio de cultivo líquido tiene un papel significativo en el desarrollo de los embriones somáticos y en su posterior germinación. Estos resultados son los primeros estudios que relacionan las características morfológicas de las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos con la densidad de inoculación utilizada para su maduración.

En la literatura científica el efecto de la densidad de inoculación en la fase de maduración se ha evaluado a través de la germinación de los embriones. Por ejemplo, Kosky *et al.* (2000) obtuvieron una mejor germinación cuando los embriones somáticos del cv. 'FHIA-18' (*Musa AAAB*) fueron cultivados con 0,8 gMF. Por su parte, Cabrera *et al.* (2002) evaluaron dos densidades de inoculación (0,5 y 1,0 gMF) de embriones somáticos del cv. 'Navolean' (*Musa ABB*) en etapa globular con 30 ml de medio de cultivo líquido. Estos autores con 0,5 gMF lograron la maduración de los embriones con el 46,89% de germinación.

Al respecto Dai *et al.* (2010) señalaron la obtención de embriones maduros del cv. 'Da Jiao' (*Musa paradisiaca* ABB Linn.) con 2,0 a 3,0mm de diámetro después de tres meses de cultivo. Los embriones somáticos comenzaron a germinar después de dos semanas de cultivo y el porcentaje de germinación fue del 40,0%. Como se ha descrito en la literatura científica existen diferencias con respecto a la densidad de inoculación y el porcentaje de germinación de los embriones somáticos. Estos aspectos han sido relacionados con el genotipo.

Sin embargo, los resultados experimentales demostraron la importancia de la densidad de inoculación en el desarrollo morfológico de los embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21' durante la fase de maduración. Los embriones somáticos cultivados con 0,6 gMF/30mL mostraron un mejor desarrollo durante esta fase, lo cual permitió un incremento en el porcentaje de germinación. A partir de estos resultados se seleccionó



esta densidad de inoculación para la maduración de embriones somáticos del cv. de plátano 'FHIA-21'.

La densidad de inoculación juega un papel importante en la formación y maduración de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido. A partir de estos resultados se seleccionó 1,5 gMF/30mL de densidad de inoculación para la formación de un mayor número de embriones somáticos con desarrollo homogéneo en el cv. 'FHIA-21'. Lo anterior se correspondió con una reducción en el contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo y se destacó el papel del calcio, magnesio, potasio y zinc en la formación de embriones somático de este cultivar. En la fase de maduración, la densidad de inoculación de 0,6 gMF/30mL permitió mayor sincronización en el desarrollo de los embriones. El 87,0% de estos presentaron de 3,1 a 5,0mm de longitud, con formación de los meristemos caulinar y radicular y la acumulación de sustancias de reserva. La determinación del contenido de nutrientes minerales del medio de cultivo reveló la importancia del hierro en esta fase. Los embriones somáticos cultivados con 0,6 gMF/30mL alcanzaron mayores porcentajes de germinación y la formación de plantas con características morfológicas adecuadas. Estas plantas mostraron una definición del pseudotallo, más de dos hojas abiertas y mayor número de raíces. La identificación de las densidades de inoculación óptimas para la formación y maduración de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido facilitó la obtención de 6 500 plantas del cv. de plátano 'FHIA-21' por embriogénesis somática.

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

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

Los resultados mostraron que el porcentaje de supervivencia de las plantas obtenidas por embriogénesis somática (98,8%) no presentó diferencias significativas con respecto a las plantas regeneradas por organogénesis (98,6%). Ambas poblaciones se adaptaron a las condiciones de crecimiento en casa de cultivo y las plantas comenzaron a emitir nuevas hojas a partir de los 10 días de cultivo (Figura 22 A). En las observaciones realizadas a los 20 días se apreció un aumento del crecimiento en ambas poblaciones, evidenciado por la elongación del pseudotallo y el desarrollo de las hojas (Figura 22 B).

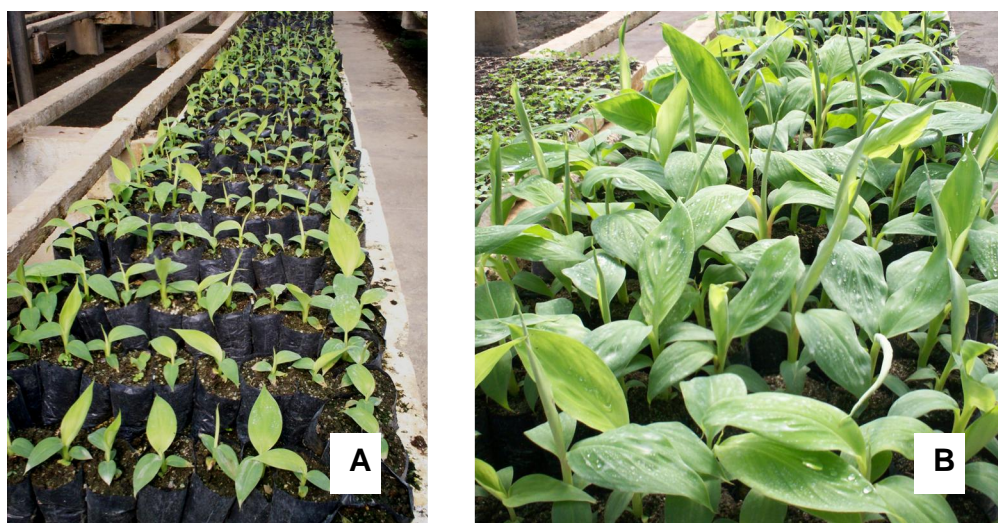


Figura 22. Plantas procedentes de embriones somáticos del cv. de plátano ‘FHIA-21’ (*Musa* AAAB) en casa de cultivo. (A) Aspectos de las plantas con 10 días de plantadas. (B) Aspecto de las plantas con 20 días después de plantadas.

La evaluación de los caracteres morfológicos demostró que no existieron diferencias significativas entre ambas poblaciones con respecto a las variables altura de la planta y número de hojas expandidas. A los 55 días de cultivo, la altura de las plantas obtenidas

por embriogénesis somática fue de 23,5 cm con un promedio de 9,2 hojas y las plantas procedentes de organogénesis promediaron 23,3 cm con 9,0 hojas expandidas.

De manera general, durante el desarrollo de las plantas en casa de cultivo se observó una homogeneidad entre las poblaciones con respecto al color del pseudotallo, color del peciolo y limbo de las hojas. No obstante, se detectaron algunas plantas con cambios fenotípicos en las hojas y en el hábito de crecimiento. Entre los cambios se observaron plantas con hojas variegadas (manchas blancas o verdes claro) (Figura 23 A), plantas con hojas dobles, las cuales consistían en dos hojas que se unían en la nervadura central y plantas con hábito de crecimiento en forma de abanico (Figura 23 B). Estos tres tipos de cambios fueron observados en ambas poblaciones. Las plantas con cambios fueron descartadas y no se llevaron a campo.

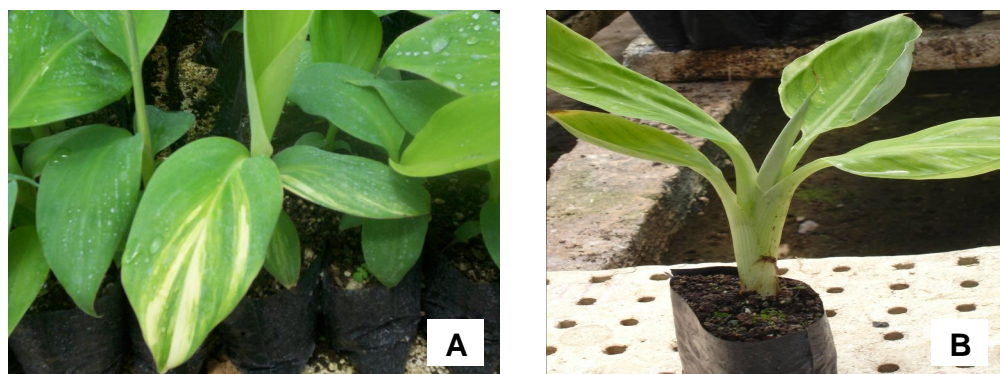


Figura 23. Plantas con cambios fenotípicos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) procedentes de embriones somáticos, a los 20 días de cultivo. (A) Planta con hojas variegadas. (B) Planta con hábito de crecimiento en forma de abanico.

La cuantificación de las plantas con cambios fenotípicos mostró menor cantidad de estas en la población obtenida por embriogénesis somática. La incidencia de los diferentes tipos de cambios fenotípicos representó el 0,19% de las plantas regeneradas por embriogénesis somática y el 0,50% de las plantas obtenidas por organogénesis (Tabla 8).

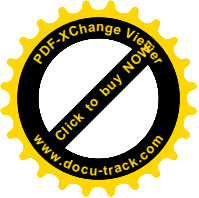
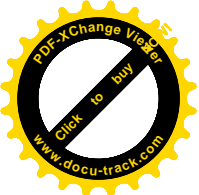


Tabla 8. Plantas con cambios fenotípicos del cv. de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) en poblaciones regeneradas por embriogénesis somática y organogénesis, a los 55 días en casa de cultivo.

Sistema de regeneración	Número de plantas	Plantas con cambios fenotípicos		
		Hojas variegadas	Hojas dobles	Disposición de hoja en forma de abanico
Embriogénesis somática	6188	5	4	3
Organogénesis	1972	2	2	6

La incidencia de variación somaclonal o plantas con cambios fenotípicos detectables durante el crecimiento en casa de cultivo ha sido ampliamente descrita en plantas regeneradas por organogénesis (Israeli *et al.*, 1991; Côte *et al.*, 1993; Sandoval *et al.*, 1997). En este sentido, la literatura científica ha referido entre los principales factores que contribuyen a la ocurrencia de cambios fenotípicos el tiempo de permanencia *in vitro* (número de subcultivos) y la exposición a diferentes tipos de reguladores del crecimiento (Jain, 2001; Sahijram *et al.*, 2003).

En plantas regeneradas por embriogénesis somática los resultados experimentales de Côte *et al.* (2000) en el banano cv. 'Grande Naine' (*Musa* AAA) mostraron solamente la presencia de dos tipos de variantes con respecto a cuatro tipos detectadas en plantas regeneradas por organogénesis. Sin embargo, contrario al presente trabajo solo encontraron un tipo de variante (plantas variegadas) común en las dos poblaciones. En la población regenerada por organogénesis hallaron plantas enanas, gigantes y con lesiones en las hojas semejantes a síntomas virales (mosaicos) y plantas con hojas dobles en las plantas regeneradas por embriogénesis somática. Al igual que en este estudio, el menor porcentaje de plantas con cambios se presentó en una población de 500 plantas procedente de embriones somáticos (1,65%). Estos autores refieren que durante el desarrollo de las plantas en campo desaparecieron los cambios observados en casa de cultivo.



En similar estudio, López *et al.* (2005) al evaluar en casa de cultivo plantas regeneradas por embriogénesis somática del cv. 'Navolean' (*Musa* ABB) señalaron un porcentaje de supervivencia del 97,0% y una variación somaclonal de 0,4 a 0,5% correspondiente a plantas variegadas. Por otra parte, Kosky *et al.* (2006) en el cv. 'FHIA-18' (*Musa* AAAB) obtuvieron un porcentaje de supervivencia del 98,5% y detectaron un mismo tipo de variante (plantas con mosaicos en las hojas) en plantas procedentes de embriones somáticos multiplicados en biorreactores (0,4%) y en plantas obtenidas por organogénesis (0,3%).

Como se ha descrito, las plantas regeneradas por embriogénesis somática mostraron alta supervivencia y con bajos porcentajes de plantas con cambios fenotípicos en casa de cultivo. La incidencia de los diferentes tipos de cambios puede estar determinada por la influencia del genotipo y por las condiciones de cultivo *in vitro*. Las condiciones de cultivo utilizadas para el desarrollo de la embriogénesis somática del cv. 'FHIA-21' proporcionaron similares resultados.

Los resultados en este estudio mostraron menor incidencia de plantas con cambios fenotípicos en la población obtenida por embriogénesis somática (0,19%), detectables en casa de cultivo. La evaluación de las plantas en campo permitirá confirmar estos resultados ya que pueden existir otros cambios solamente detectados en estas condiciones.