

## Análisis de patrones morfológicos y anatómicos en la embriogénesis somática del banano Williams (AAA)

### Analysis of the morphological and anatomical patterns in the somatic embryogenesis of Williams banana (AAA)

Maribel Ramírez-Villalobos\*, Eva de García\*\*, Helga Lindorf\*\*\*

#### Resumen

La embriogénesis somática representa una herramienta esencial en el mejoramiento genético y en la micropropagación clonal masiva de bananos mejorados. En el presente trabajo se analizaron los patrones morfológicos y anatómicos que ocurren durante la embriogénesis somática del banano Williams, dirigidos a conocer y mejorar este proceso. En la investigación se establecieron suspensiones celulares embriogénicas (SCE) a partir de callo embriogénico obtenido de manos florales inmaduras masculinas, las cuales originaron abundantes embriones que regeneraron plantas. Hacia los tres meses de cultivo se detectaron embriones somáticos (ES) primarios color blanco-crema en las manos florales de los nudos nueve a doce, contados a partir del ápice floral. Al cuarto mes estos ES primarios dieron origen al callo embriogénico, de color blanco crema, estructura granular, con abundantes ES torpedo en su periferia y con una organización celular en tres diferentes zonas. De este callo se cultivaron porciones pequeñas con ES torpedo en medio de multiplicación durante dos meses, dando origen a la SCE I. La misma se tamizó (250 µm) para establecer la SCE II. El sedimento de células y los agregados celulares embriogénicos de ambas SCE se trasladó a medio de maduración. Transcurridos dos meses los embriones maduros se transfirieron a medio de conversión de embriones, lográndose regenerar plantas completas a partir de las dos semanas. Las SCE produjeron numerosos embriones somáticos maduros y mostraron una buena conversión de embriones a plantas y regeneración de plantas. Este sistema de embriogénesis somática permitió la obtención de plantas funcionales en nueve meses.

**Palabras clave:** *Musa*, callo embriogénico, suspensiones celulares embriogénicas, embriones maduros, conversión de embriones.

**Abreviaturas:** SCE suspensión celular embriogénica.

#### Abstract

Somatic embryogenesis represents an essential tool for the genetic improvement and for the mass clonal micropropagation of the improved banana plant. In this present work morphological and anatomical patterns were analyzed in the somatic embryogenesis of Williams banana, to know and enhance this process. In the investigation embryogenic cell suspensions (ECS) were established from embryogenic callus obtained from floral immature male hands, which gave rise to many somatic embryos that regenerated plants. Towards the three months of culture white-cream primary somatic embryos (SE) were detected in the floral hands of the nodes nine to twelve, counted from the floral apex. At the fourth month this primary SE gave origin to a creamy-white embryogenic callus, with granular structure and abundant SE torpedo on its periphery. Cell

\* Ing. Agrónoma, Magister Scientiarum en Fruticultura, Doctora en Ciencias. Profesora Titular. Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia (LUZ). A.P. 15205, ZU4005, Venezuela. Autor para correspondencia. mcramire@fa.luz.edu.ve.

\*\* Lcda. en Biología, Master of Science (USA), Doctora en Ciencias. Profesora Titular. Jefa del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Los Chaguaramos, Caracas 1041, Venezuela.

\*\*\* Lcda en Biología. Profesora Emérita del Centro de Botánica Tropical. Laboratorio de Morfología y Anatomía Vegetal, IBE, Facultad de Ciencias, UCV.

organization with three different zones was observed in callus. Small portions of this callus were cultivated in the multiplication medium for two months, to originate ECS I. This ECS was filtered through a mesh (250 µm pore size) to establish the ECS II. The sediment of embryogenic cells and cell clusters of the ECS were moved to maturation media. After two months the mature embryos were transferred to conversion medium, and two weeks later, whole plants were developed. The ECS produced numerous mature SE, which showed good conversion of embryos into plants and plant regeneration. This system of somatic embryogenesis permitted the mass production of functional plants in nine months.

**Key words:** *Musa*, embryogenic callus, embryogenic cell suspension, mature embryos, conversion of embryos.

**Recibido:** septiembre 20 de 2011    **Aprobado:** mayo 14 de 2012

## Introducción

El cultivo de bananos y plátanos (*Musa* spp.) se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde ambos cultivos tienen gran importancia socioeconómica y nutricional, debido a que son fuente de alimento, empleo e ingreso económico. Los bananos del subgrupo Cavendish, entre ellos el Williams (AAA), son los más cultivados y dominan el mercado mundial. Venezuela en particular destinó para este cultivo una superficie de siembra de 35.096 ha, y tuvo una producción estimada de 551.823 t y rendimientos de 15,72 t/ha en el año 2007 (Fedeaagro, 2011).

La producción de bananos y plátanos en Venezuela ha sido fuertemente afectada por la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) (Martínez *et al.*, 2007), la cual se manifiesta por la presencia de manchas negras en las hojas de la planta, que ocasiona una reducción de la superficie foliar funcional. Por consiguiente, la planta muestra debilitamiento, producción de racimos pequeños, con menor número de manos, y frutos pequeños con maduración precoz. Esta situación ha ocasionado grandes pérdidas en la producción de frutas y para controlarla es necesario aplicar técnicas biotecnológicas en su mejoramiento genético y micropropagación clonal de cultivares mejorados.

El éxito de la aplicación de la biotecnología moderna, como es la transformación genética depende entre otros factores de protocolos reproducibles y eficientes de regeneración de plantas a través de suspensiones celulares embriogénicas y formación de embriones somáticos. Sin embargo, la carencia de protocolos de regeneración de plantas es en muchos casos el principal obstáculo para llevarla a cabo (Jalil *et al.*, 2003; Caboni *et al.*, 2002).

La embriogénesis somática es un proceso morfogénico que permite obtener altos volúmenes de produc-

ción de plantas clonadas, en un período de tiempo corto y con menores costos. En *Musa* este proceso se ha logrado establecer en algunos bananos y plátanos a partir de manos florales inmaduras (Pérez y Rosell, 2008; Namanya *et al.*, 2004; Strosse *et al.*, 2003; Filippi *et al.*, 2001; Grapin *et al.*, 2000; Escalant *et al.*, 1994) y se dispone de algunas técnicas estándar. Sin embargo, todavía existen varias limitaciones en el sistema durante la etapa de inducción de callo embriogénico, el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas, la maduración de embriones somáticos y la conversión posterior de éstos a plantas, los cuales difieren en otros genotipos de bananos y plátanos, por lo que no puede considerarse un protocolo común. Strosse *et al.* (2003) indicaron que una de las limitantes es que pocos callos embriogénicos resultan en una buena suspensión celular. Dada la importancia de los bananos, a nivel mundial y específicamente en Venezuela, en esta investigación se planteó como objetivo analizar los patrones morfológicos y anatómicos que ocurren durante la embriogénesis somática del banano Williams, dirigidos a conocer y mejorar el proceso. En la investigación se establecieron suspensiones celulares embriogénicas que originaron abundantes embriones somáticos que se diferenciaron y formaron plantas completas.

## Materiales y métodos

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, IBE, UCV. Se utilizó como material vegetal el banano Williams, un triploide con genoma acuminata (AAA), que presenta rasgos similares al Giant Cavendish y se cultiva en mayor proporción en los Valles de Aragua, estado Aragua, Venezuela.

## Material vegetal

Se recolectaron inflorescencias masculinas de banano Williams en la Hacienda "La Cuarta Perena" ubi-

cada en el Sector Palo Negro de Maracay, municipio Libertador, estado Aragua, Venezuela. Las inflorescencias se redujeron a 2,5 cm de largo (Escalant *et al.*, 1994), se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% por 5 min y luego se realizó un enjuague con agua destilada esterilizada. Con ayuda de un estereoscopio (Poland PZO) se extrajeron de cada inflorescencia las manos florales ubicadas entre los nudos siete a dieciséis, contados a partir del ápice floral.

### **Obtención de callo embriogénico**

Inmediatamente las manos florales se transfirieron al medio de inducción de callo MIC descrito por Escalant *et al.* (1994), gelificado con 7 g/L de agar-agar y distribuido en frascos de vidrio pequeños (6,5 cm de altura x 5,5 cm de diámetro) con 30 mL de medio. Las manos florales se mantuvieron bajo oscuridad a  $26 \pm 1$  °C hasta la formación de callo embriogénico. Paralelamente se preparó un testigo con manos florales establecidas en MIC sin las auxinas ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Se utilizó un diseño experimental totalmente al azar con arreglo en parcelas divididas en el tiempo con ocho repeticiones y treinta manos florales como unidad experimental en cada nudo floral. En cada tratamiento, medio con auxinas y sin auxinas, se determinaron las siguientes variables: porcentaje de manos florales con embriones somáticos primarios (PMEP), con callo embriogénico (PMCE), con callo no embriogénico (PMCN) y el número de embriones por cm<sup>2</sup> de callo. Los datos de las variables se analizaron mediante el procedimiento MLG del programa SPSS versión 12 (Pérez, 2005).

### **Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas**

Se transfirieron 240 mg de callo embriogénico, que contenía abundantes embriones somáticos en etapa de torpedo, a 10 mL de MIC sin antioxidante contenidos en enlarmeyers de 50 mL, estableciendo la suspensión celular embriogénica I (SCE I). Las suspensiones se mantuvieron en oscuridad a  $26 \pm 1$  °C bajo agitación orbital (INNOVA 2100 con 19 mm de órbita circular) a 100 rpm y con recambio de medio fresco (50% del medio) cada siete días durante dos meses. Posteriormente la SCE I se tamizó con una rejilla (tamaño de poro 250 µm) obteniendo la SCE II, la cual se inició en enlarmeyers de 150 mL con 20 mL de medio, 2% de VCS y 30% de medio de la SCE I. A las SCE II se les efectuó recambio de medio cada doce días, período establecido luego de realizada la cinética de crecimiento en ésta. A ambas suspensiones se les

eliminaron las estructuras globulares amarillas visibles mayores de tres milímetro.

### **Regeneración de plantas**

#### **Maduración de embriones somáticos**

A partir de los sedimentos de las SCE I y SCE II de dos meses de crecimiento, se transfirió un mililitro de sedimento de células y agregados celulares (menores de 1 mm), a diferentes medios de maduración (donde los embriones se diferencian y maduran) de embriones somáticos: MM1 o medio testigo conformado por el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) sin reguladores de crecimiento y gelificado con 1,8 g/L de fitagel, MM2 (descrito por Côte *et al.* (1996)) gelificado con 7 g/L de agar-agar; y MM3 medio MS (1962) con 0,2 mg/L de BA y 1,8 g/L fitagel. Por otra parte las estructuras globulares amarillas embriogénicas de 3 mm aproximadamente presentes en las suspensiones celulares embriogénicas también se cultivaron en los MM1, MM2 y MM3.

Después de un mes de cultivo en los medios de maduración se estimó el número de embriones maduros por mililitro de sedimento de células y agregados embriogénicos de la suspensión (NEM), así como el número de embriones maduros por estructura globular amarilla embriogénica (NEE). En cada uno de estos medios se usaron diez repeticiones, cada una con un mililitro de células y agregados sedimentado de las SCE I y SCE II. En el caso de las estructuras globulares amarillas embriogénicas se realizaron veinte repeticiones con cinco estructuras cada una.

#### **Conversión de embriones a plantas**

Los embriones somáticos maduros se transfirieron a dos medios de conversión de embriones somáticos a plantas, CP1 y CP2. CP1 constituido por el medio señalado por Strosse *et al.* (2003) y gelificado con 2 g/L de fitagel, y CP2 diseñado a partir del medio MS (1962) con la adición de 0,4 mg/L de BA y 2 g/L de fitagel. Transcurrido un mes se determinó el porcentaje de conversión de embriones (PC) y el porcentaje de vitroplantas obtenidas (PV). En los medios de conversión de embriones a plantas se emplearon veinte réplicas o frascos, en las cuales se colocaron cinco grupos de embriones maduros (4 a 5 embriones), o bien cinco estructuras globulares embriogénicas por frasco. Las variables NEM, NEE, PC y PV de suspensiones celulares embriogénicas de banano Williams obtenidas a partir de manos florales inmaduras masculinas, se analizaron

mediante el procedimiento MLG univariante del programa SPSS versión 12 (Pérez, 2005).

### **Análisis morfoanatómico de manos florales inmaduras masculinas bajo cultivo**

Se realizaron observaciones morfológicas a las manos florales sin cultivo y cultivadas en medio MIC (con auxinas) y sin auxinas hasta la obtención de callo embriogénico. Paralelamente se hizo un estudio anatómico para lo cual se tomaron tres ejemplares que se fijaron, se incluyeron en parafina, se seccionaron (10  $\mu\text{m}$ ) y se colorearon en safranina-fast green (Ramírez *et al.*, 2008), considerando un tiempo de 30 min en la deshidratación con alcohol butírico terciario y en la inclusión en parafina.

Adicionalmente se tomaron pequeñas porciones de la periferia de los callos embriogénicos y se montaron en agua-glicerina al 50% para su observación directa en el microscopio de luz (Nikon type 108). Estos callos también se procesaron mediante la técnica de corte fino (Ramírez *et al.*, 2006), se cortaron (0,5  $\mu\text{m}$ ) con ultramicrotomo (Sorvall, Porter BlumNT2B), se colorearon con Smogyi filtrado (azul de toluidina al 1% y azul II al 1%) y se montaron en Entellan para observación anatómica al microscopio de luz.

## **Resultados y discusión**

### **Obtención de callo embriogénico**

Transcurridos tres meses se observó la presencia de embriones somáticos primarios en 31,5% de las manos florales inmaduras masculinas cultivadas en el medio de inducción de callo MIC (con auxinas). Al cuarto mes sólo el  $2,8 \pm 0,2\%$  de las manos florales formaron callo embriogénico con abundantes embriones somáticos en su superficie ( $42 \pm 3,3$  embriones/ $\text{cm}^2$ ) y el  $67,1 \pm 7,8\%$  de las manos callo no embriogénico. El porcentaje de manos florales con callo embriogénico se mantuvo constante detectándose sólo un aumento en la cantidad de callo y en el número de embriones ( $58 \pm 8,1$ , embriones/ $\text{cm}^2$ ) al quinto mes. El porcentaje de callo embriogénico obtenido en esta investigación se encuentra dentro del rango indicado en *Musa* (Youssef *et al.*, 2010; Namanya *et al.*, 2004; Strosse *et al.*, 2003). Aunque generalmente en los bananos la tasa de obtención de callos embriogénicos, a partir del cultivo de manos florales inmaduras, es relativamente baja (Albarrán *et al.*, 2009) y depende del genotipo (Albarrán *et al.*, 2009; Youssef *et al.*, 2010).

Sin embargo, de las 2400 manos florales inmaduras masculinas cultivadas en medio MIC sólo aquellas de los nudos nueve a doce (960 manos), mostraron competencia embriogénica hacia la formación de embriones somáticos primarios 756 manos, y hacia la producción de callo embriogénico 68 manos. Tomando en consideración sólo el cultivo de éstas últimas manos florales, el porcentaje de manos florales con embriones somáticos y el porcentaje de manos florales con callo embriogénico en el banano Williams se incrementó a 78,8% y 7,1%, respectivamente.

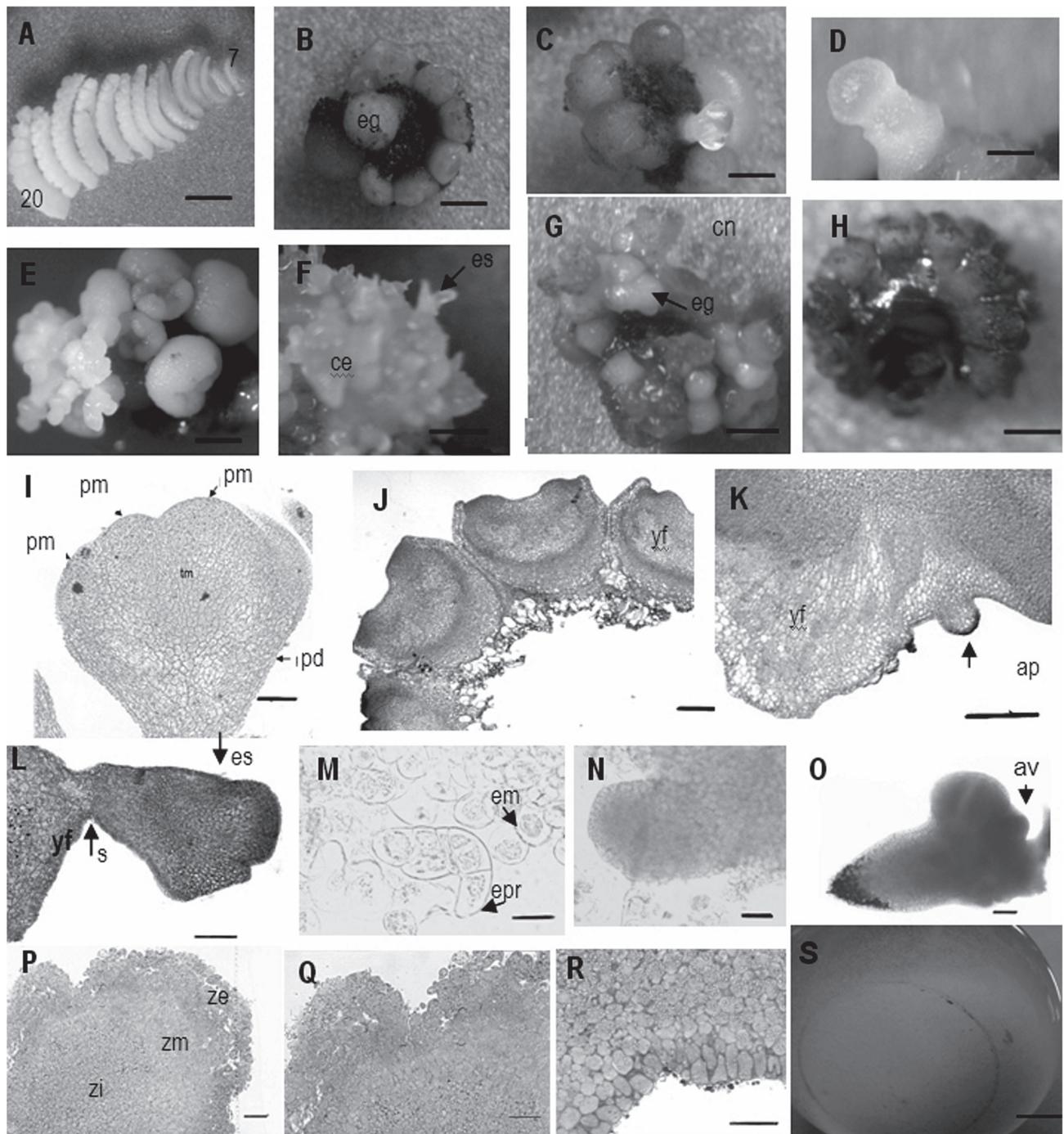
El análisis estadístico mostró que entre las manos florales de los nueve a doce no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en cuanto al porcentaje de manos florales con embriones somáticos y el porcentaje de manos florales con callo embriogénico.

El sistema obtenido en esta investigación demostró que sólo era necesario cultivar las manos florales mencionadas, y no las de los nudos siete a dieciséis según lo indicado por Escalant *et al.* (1994) y Strosse *et al.* (2003), lo que permitiría disminuir costos de producción. Además los resultados sugieren la necesidad de nuevos estudios morfoanatómicos y fisiológicos durante la etapa de inducción de callo embriogénico para mejorar la respuesta de los embriones somáticos hacia la producción de callo embriogénico.

### **Cambios morfológicos y anatómicos en manos florales inmaduras masculinas bajo cultivo**

A los dos meses todas las manos florales inmaduras cultivadas en el medio MIC se enrollaron y aumentaron de tamaño (figuras 1A-B). Al tercer mes se apreció la formación de pocas estructuras globulares amarillas en todos los explantes (figuras 1B-C), así como de embriones somáticos primarios en las manos florales de los nudos nueve a doce. Estos embriones mostraron diferentes etapas de desarrollo globular, alargado (figuras 1C-D) y torpedo, los cuales al mantenerse en medio con auxinas produjeron callo embriogénico con abundantes embriones somáticos, en los diferentes etapas de desarrollo, fácilmente separables, predominando el torpedo (figuras 1E-F), hacia el cuarto mes de cultivo.

En el resto de los nudos florales, las manos sólo aumentaron de tamaño, formaron estructuras globulares amarillas y muy poco callo no embriogénico (figura 1G). Las manos florales cultivadas en medio sin auxinas (testigo) no produjeron ningún tipo de callo, sólo se enrollaron y se oxidaron o ennegrecieron totalmente (figura 1H), lo cual condujo a la muerte de los mismos como ocurre en otras especies (Kim *et al.*, 2006; Urbanek *et al.*, 2004). Esta respuesta corrobora



**Figura 1.** A) Manos florales inmaduras masculinas de banano Williams abarcando las de los nudos del veinte al siete (el primer nudo dentro de la inflorescencia es el más cercano al ápice floral). B-G) Mano floral cultivada en medio con auxinas. C-D) Embriónes somáticos primarios. E-F) Callo embriogénico, con embriones somáticos en etapa torpeda en la periferia en F. G) Estructuras globulares amarillas callo no embriogénico. H) Mano floral en medio sin auxinas. I) Yema floral de mano floral. J-K) Mano floral, 2,5 meses en medio con auxinas. L) Embrión somático en etapa torpeda. M) Células embriogénicas y estructuras proembriónicas en periferia de callo embriogénico N) Embrión somático globular. O) Embrión en estado avanzado de desarrollo. P-R) Corte semifino de callo embriogénico. S) Suspensión celular embriogénica, dos meses. ap, agregado proembriónico. av, ápice del vástago. c, cotiledón. ce, callo embriogénico. cn, callo no embriogénico. eg, estructura globular amarilla. em, célula embriogénica. epr, estructura proembriónica. es, embrión somático. ga, gránulo de almidón. pd, protodermis. pm, primordio de pieza floral. s, suspensor. tm, tejido meristemático. yf, yema floral. ze, zona externa. zi, zona interna. zm, zona media. Barra: A,E = 2 mm; B,C,H = 1,25 mm; D = 0,77 mm; F = 1 mm; G = 4 mm; J-K = 200 µm; L = 100 µm; I,M-R = 50 µm; S = 16 mm.

el hecho de que las auxinas ANA, AIA y 2,4-D son necesarias para la inducción de callo embriogénico en el banano Williams, al igual que en otros bananos (Jalil *et al.*, 2003; Lerma *et al.*, 2002; Fillippi *et al.*, 2001).

Las secciones longitudinales de manos florales cultivadas en medio de inducción de callo MIC, comparadas con el explante inicial, mostraron la formación de embriones somáticos primarios en la superficie de la yema floral (figuras 1I-K), sin intervención de fase de callo (embriogénesis directa), hacia los dos meses y medio. Estos embriones somáticos primarios se proponen como un marcador morfológico temprano de la embriogénesis somática en el banano Williams. Los embriones se apreciaron inicialmente como una masa o agregado proembrionario (figura 1K), a partir del cual se diferenciaron embriones somáticos, que se observaron principalmente en etapa alargado y torpedo (figura 1L) con un suspensor en la base.

Es importante resaltar que es la primera vez que se reportan en investigaciones de bananos y plátanos dos hechos: el primero, la formación directa de embriones somáticos primarios a partir de yemas florales de la mano floral del banano Williams, y el segundo que estos embriones primarios dan origen al callo embriogénico con abundantes embriones torpedo y alta capacidad de regenerar embriones que evolucionan en plantas.

En el aspecto morfológico los callos embriogénicos presentaron color blanco-crema, estructura granular, laxa y abundantes embriones somáticos en su periferia, principalmente en etapa torpedo (figuras 1M-O). Estructuralmente en este tipo de callo se apreciaron tres zonas diferentes: externa, media e interna (figuras 1P-R). La zona externa con varias capas de células embriogénicas y estructuras proembrionarias dispuestas laxamente, en ciertas partes lució uniestratificada con algunas células en división, lo que ocasionó que se desprendiera gran parte de esta zona durante el procesamiento de la muestra. Estas estructuras proembrionarias y células embriogénicas pequeñas algo redondeadas u ovoides, presentaron alta proporción núcleo a citoplasma, pared gruesa y citoplasma muy denso. Estas características son típicas de células donde ocurre alta actividad metabólica, intensa síntesis de ARN (Komaine, 2003) y altos niveles de otros componentes del citoplasma (Mikula *et al.*, 2004).

La zona media presentó células de forma irregular y alta división celular. La zona interna con varias capas de células penta-hexagonales, con numerosos gránulos de almidón, lo que permite que haya máxima conexión célula a célula y mayor estabilidad del tejido

(Moghaddam y Taha, 2005). Las modificaciones en la forma de la célula se relacionan con posibles cambios ocurridos en la pared celular que eventualmente llevan al aislamiento de las células que orientan su función hacia la formación de callo (Mikula *et al.*, 2004).

Las características morfológicas de este tipo de callo coinciden con las señaladas en otras investigaciones en *Musa* (Jalil *et al.*, 2008; Urdaneta *et al.*, 2006; Houllou *et al.*, 2005), sin embargo, estos trabajos no indican la presencia de embriones torpedo en el callo, ni analizan los aspectos anatómicos del callo embriogénico como la organización celular, en tres zonas, observada en el callo embriogénico del banano Williams. Urdaneta *et al.* (2006) realizaron una breve descripción sólo de los diferentes callos obtenidos durante la etapa de inducción de embriogénesis somática de banano Williams, las cuales no coinciden completamente con la organización obtenida en esta investigación.

La presencia de células embriogénicas, estructuras proembrionarias y embriones torpedos en la zona externa del callo embriogénico del banano Williams refleja la alta capacidad morfogénica del mismo. Sin embargo, los embriones en etapa torpedo ubicados en la periferia del callo se consideraron indicativos de un callo con alta frecuencia embriogénica y adecuado para la obtención de suspensiones celulares embriogénicas con alta capacidad para la producción de plantas. Por lo que la presencia de estos embriones torpedo se proponen como un posible marcador morfológico temprano de un proceso de embriogénesis somática altamente eficiente para el banano Williams iniciado a partir de manos florales inmaduras masculinas. Entre otras características consideradas también importantes y complementarias para diagnosticar la capacidad embriogénica del callo se encontraron: la estructura granular y el color blanco crema.

### **Suspensiones celulares embriogénicas**

Las SCE I y SCE II presentaron 100% de éxito durante su establecimiento y se conservaron viables, de color blanco-crema-claro y sin problemas de oxidación (figura 1S) durante un período de doce meses con subcultivos cada dos meses. El alto porcentaje de éxito logrado en las suspensiones celulares embriogénicas obtenidas a partir de manos florales inmaduras masculinas en el banano Williams se asocia a la composición celular de las SCE I, las cuales se iniciaron en un pequeño volumen de medio -sin antioxidantes- con pequeñas cantidades de callo embriogénico más embriones somáticos torpedo. El porcentaje de éxito logrado en el establecimiento las SCE I y SCE II se considera muy alto al compararlo con el reportado en investigaciones

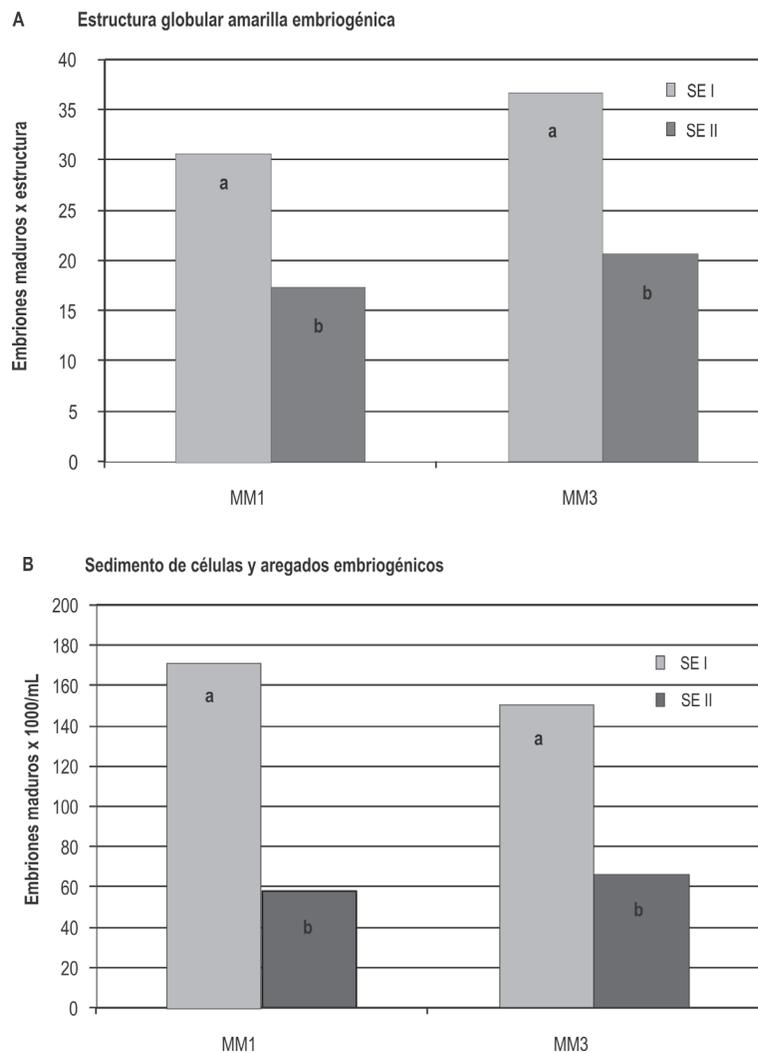
de banano Gran enano (AAA) que oscila entre 59 y 62% de viabilidad (Lerma *et al.*, 2001). Jalil *et al.* (2003) señalaron que el establecimiento de suspensiones celulares en banano Mas (AA) resultó crítico debido a la oxidación de las mismas posiblemente por exudados fenólicos, los cuales afectan la viabilidad de las células.

### Regeneración de plantas

Tanto el sedimento de un mililitro de células y agregados celulares (menores de 1 mm) como las estructuras globulares amarillas embriogénicas de las SCE I, cultivados en los medios de maduración MM1 y MM3 produjeron muchos embriones somáticos maduros

hacia los dos meses de iniciadas (figuras 2A-B), no detectándose diferencias en el uso de ambos medios. Las SCE I presentaron mayor la cantidad de embriones maduros que las SCE II en los medios MM1 y MM3. Los embriones somáticos maduros se detectaron como estructuras individuales, blanco-crema, de forma redonda a alargada con inicios de desarrollo del vástago y en algunos casos con una ligera ondulación en uno de los extremo del embrión (sitio del futuro ápice del vástago).

La respuesta lograda en los medios diseñados en esta investigación MM1 (testigo, sin reguladores de crecimiento) y MM3 (0,4 mg/L de BA y 0,193 mg/L de AIA),



**Figura 2.** Número de embriones maduros por estructura globular amarilla embriogénica y por cada mililitro de sedimento de células y agregados celulares embriogénicos, provenientes de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) de banano Williams. SCE I, SCE iniciada con porción de callo embriogénico más embriones somáticos torpedo. SCE II, establecida mediante el tamizado de SCE I. MM1, medio de maduración sin reguladores de crecimiento. MM3, medio de maduración con 0,4 mg/L de BA y 0,193 mg/L de AIA. Medias con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

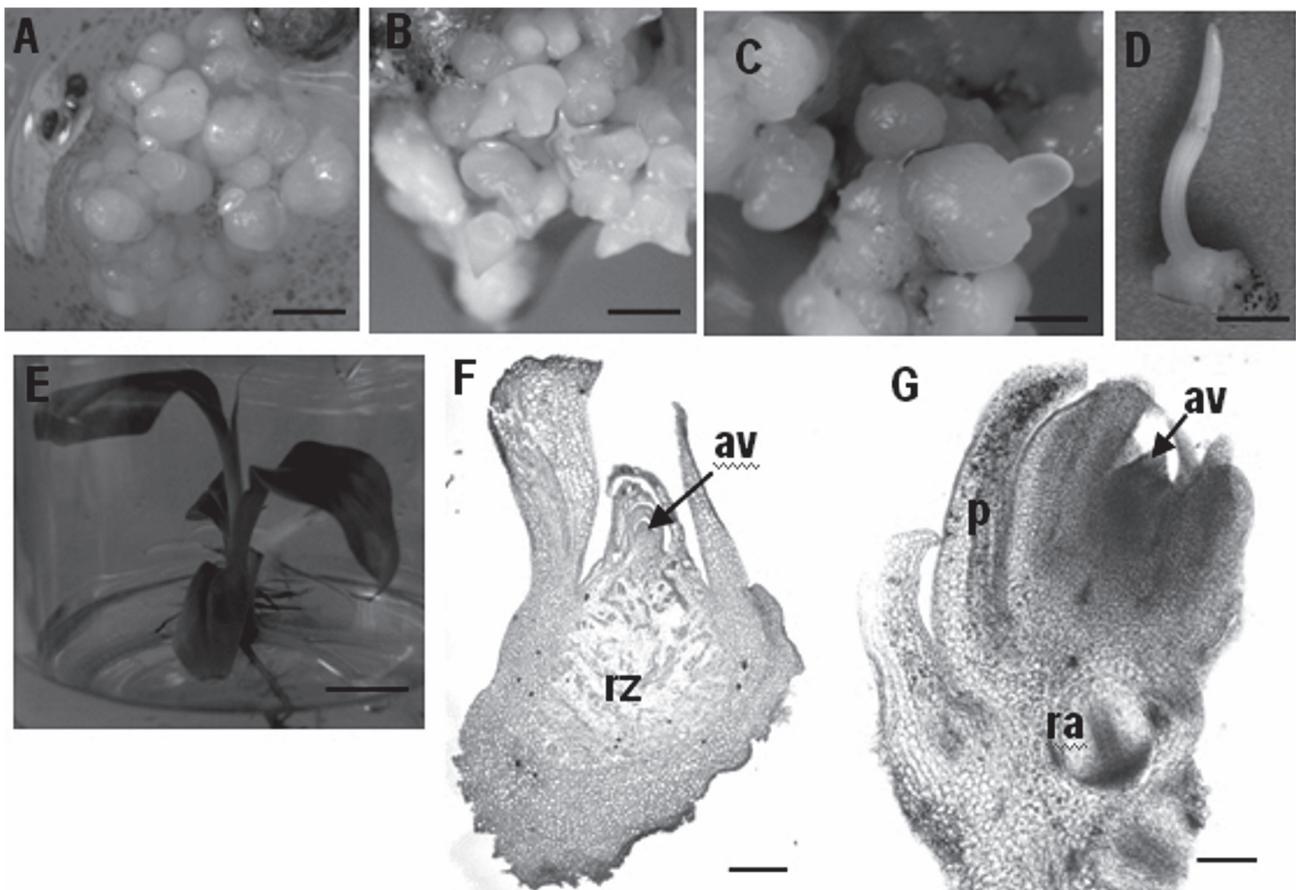
comparada con MM2 (Côte *et al.*, 1996), demostró nuevamente que la maduración de embriones somáticos en el banano Williams no requiere de la presencia de citoquininas y auxinas en el medio, o bien que sólo necesita pocos reguladores de crecimiento, en mínimas concentraciones. Es posible que los embriones tengan un balance citoquinina/auxina endógeno que favorece la inducción del proceso de maduración. En otros sistemas de embriogénesis somática de bananos y plátanos iniciados a partir de escalpos (Ramírez y de García, 2008; Strosse *et al.*, 2003; 2006), la maduración de los embriones se induce mediante el uso de medios nutritivos sin reguladores de crecimiento.

Los medios de maduración MM1 y MM3 permitieron en los embriones somáticos un adecuado balance hormonal hacia la formación y desarrollo inicial del vástago (figuras 3A-B), sin problemas de oxidación en los tejidos. En MM2 solo se observó oxidación de los tejidos y del sedimento de células y agregados celulares,

y en algunos casos formación de callo a nivel de las estructuras globulares amarillas embriogénicas procedentes de las SCE I y SCE II.

Los resultados obtenidos en MM2 contrastan con lo reportado en otras investigaciones sobre la maduración de embriones somáticos de diferentes clones de banano y plátano, es así que la maduración de embriones en medios con las citoquininas y las auxinas indicadas por Côte *et al.* (1996) en MM2 han proporcionado resultados satisfactorios en los bananos Gran enano (Georget *et al.*, 2000; Escalant *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1997) y Mas (AA) (Jali *et al.*, 2003), y en plátanos Curare (Grapin *et al.*, 2000) y FHIA-21 (Daniels *et al.*, 2002).

Transcurrido un mes los embriones maduros de MM1 y MM3 transferidos al medio de conversión propuesto CP2 (0,4 mg/L de BA) lograron desarrollar el vástago (figuras 3B-D) y posteriormente emitir raíces (figuras



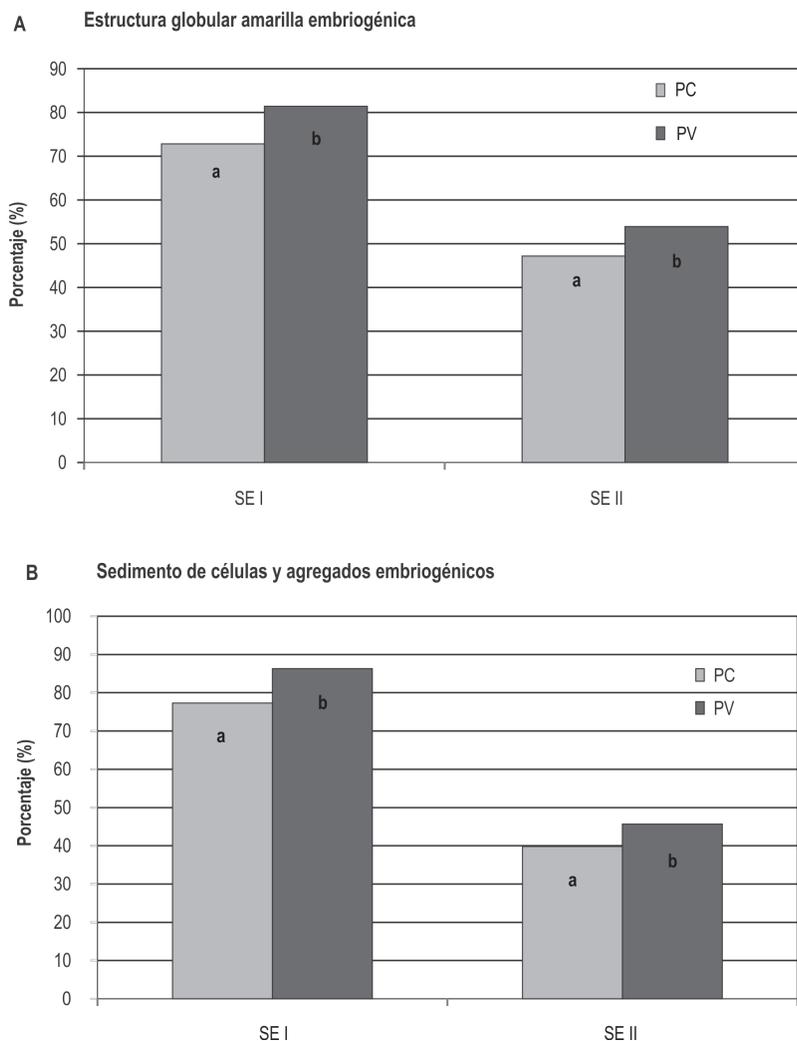
**Figura 3.** A-B) Embriones somáticos en medio de maduración, dos meses. C-D) Embriones somáticos en medio de conversión de embriones, 1,5 meses. E) Planta regenerada, 1,5 meses. F-G) Corte longitudinal de embriones somáticos en medio de conversión, un mes de cultivo. av, ápice del vástago. p, primordio foliar. ra, raíz adventicia. rz, rizoma. Barra: A-B, D = 2,5 mm; C = 1,5 mm; E = 10 mm; F = 0,2 mm; G = 0,4 mm

3E). En estos embriones inicialmente se observó el ápice del vástago localizado en el centro del rizoma y rodeado de primordios foliares (figuras 3F-G).

El medio CP2 se diseñó y evaluó debido a que el medio CP1, con las citoquininas y auxinas recomendadas para bananos y plátanos (Jalil *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2003; Georget *et al.*, 2000; Escalant *et al.*, 1994), no produjo resultados satisfactorios en el banano Williams. En CP1 los embriones somáticos se oxidaron y ocasionalmente produjeron callo. En otros bananos y plátanos se han regenerado plantas al utilizar los reguladores de crecimiento de CP1 (Jali *et al.*, 2003;

Daniels *et al.*, 2002; Georget *et al.*, 2000; Grapin *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 1997; Escalant *et al.*, 1994).

El porcentaje de conversión de embriones a plantas y el porcentaje de vitroplantas obtenidas (en un mes) resultó alto tanto en las estructuras globulares amarillas embriogénicas como en el sedimento de células y agregados celulares (figuras 4A-B), siendo mayores ambos porcentajes en los embriones maduros procedentes de las SCE I. Esto demuestra que las SCE I poseen mayor capacidad embriogénica y de regeneración de plantas que las SCE II. Este resultado sugiere que no es necesario ni conveniente realizar el tamizado de la



**Figura 4.** Porcentaje de conversión de embriones somáticos a plantas (PC) y porcentaje de vitroplantas obtenidas (PV) en embriones maduros procedentes de estructuras globulares amarillas embriogénicas (A) y del sedimento de células y agregados celulares embriogénicos (B) presentes en suspensiones celulares embriogénicas (SE) de banano Williams. SCE I, SCE iniciada con porción de callo embriogénico más embriones somáticos torpeda. SCE II, establecida mediante el tamizado de SCE I. Medias con letras distintas en cada variable difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

SCE I para establecer SCE II, porque éste sólo permite el paso de células y agregados celulares pequeños, quedando sobre la rejilla una cantidad apreciable de embriones somáticos aptos para la siguiente fase de maduración.

Otro aspecto importante es que con el tamizado pasan todas las células y agregados celulares pequeños (menores de 250  $\mu\text{m}$ ), tanto embriogénicos como no embriogénicos. Esto pudo haber cambiado la composición celular de la suspensión, quedando en la SCE II sólo células y agregados celulares y embriones en etapas iniciales. En la SCE II se detectó mayor cantidad de células no embriogénicas y agregados no embriogénicos en su composición (Datos no publicados).

El porcentaje de conversión de embriones a plantas y el porcentaje de vitroplantas obtenidas son superiores a los señalados para banano Mas (AA) (Jalil *et al.*, 2003) y Nakyetengu (AAA) (Namanya *et al.*, 2004), y similares a los reportados para el diploide Mas en medios de maduración con carbón activado (Jalil *et al.*, 2008). En varios trabajos de embriogénesis somática con diferentes clones de *Musa* no se logró la regeneración de plantas (Bui y Tran, 2004; Arteaga *et al.*, 2002; Filippi *et al.*, 2001) o bien se ha obtenido una respuesta muy baja (Trujillo *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 1997).

El protocolo de embriogénesis somática establecido en el banano Williams a partir de manos florales inmaduras masculinas, que aquí se presenta, se considera altamente eficiente por su alta producción de embriones somáticos maduros y efectiva conversión de los mismos a plantas, en un período de nueve meses.

## Conclusiones

En el sistema de regeneración establecido en esta investigación se demostró la alta competencia embriogénica de las manos florales inmaduras masculinas de banano Williams de los nudos nueve a doce (siendo el primer nudo el más cercano al ápice floral), al ser cultivadas en medio con las auxinas 4 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de ANA y AIA, dando origen a callo embriogénico con alta capacidad para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas y alto potencial de regeneración de plantas. Manos de otras posiciones no fueron tan efectivas como había sido reportado en otras investigaciones.

Los análisis morfológicos y anatómicos mostraron que los callos embriogénicos en el banano Williams se produjeron a partir de embriones somáticos primarios formados directamente de las manos florales. Estos callos embriogénicos se caracterizaron por la presencia de

abundantes embriones somáticos en etapa torpedo en su periferia. Los embriones somáticos primarios formados en las manos florales y los embriones secundarios en etapa de torpedos en la periferia del callo embriogénico constituyen marcadores morfológicos tempranos de una embriogénesis somática con alto potencial de producción de plantas en el banano Williams.

Es importante resaltar que en este trabajo se reporta por primera vez en investigaciones de bananos y plátanos, la formación directa de embriones somáticos primarios a partir de yemas florales en manos florales del banano Williams y se establece además el importante papel de estos embriones primarios en la formación de callo embriogénico con abundantes embriones torpedo y de una alta capacidad de regenerar nuevos embriones que evolucionan en plantas. Este evento se hizo cíclico permitiendo la constante producción de nuevos embriones siempre que los tejidos se mantengan en medio de inducción.

El protocolo que aquí se presenta suprime la necesidad de usar medios diferentes para la diferenciación de los embriones y la maduración de los mismos. Los medios MM1 y MM3 permitieron un balance hormonal endógeno adecuado para que los embriones evolucionaran sin problemas de oxidación. En todo el sistema se necesitan solo tres medios: inducción de callo, diferenciación y maduración de embriones y un tercer medio de germinación y conversión de embriones.

Las suspensiones celulares embriogénicas I (SCE I) del banano Williams, iniciadas con callo embriogénico y embriones somáticos torpedos, produjeron mayor cantidad de embriones maduros por mililitro de sedimento de células y agregados celulares embriogénicos de la suspensión, alta conversión de embriones a plantas y alto porcentaje de vitroplantas obtenidas, en relación a las suspensiones SCEII, lo que permite concluir que en este sistema podemos prescindir del establecimiento de la SCEII.

El protocolo de regeneración y el análisis detallado de eventos morfológicos y anatómicos en la embriogénesis somática del banano Williams, a partir de manos florales, aportan mejoras a los trabajos realizados por otros autores para otros clones de banano, y esto se demuestra porque los resultados en producción de embriones maduros, y desarrollo de vitroplantas superan a los reportados por esos autores.

Los resultados obtenidos en esta investigación aportan novedosos e interesantes elementos para la caracterización morfológica y anatómica de los procesos de embriogénesis somática en el banano Williams, y sien-

tan la base para la continuación de estudios morfoanatómicos y fisiológicos en la etapa de inducción de callo embriogénico orientados a mejorar la respuesta de los embriones somáticos primarios hacia la producción de callo embriogénico.

## Agradecimientos

Agradecimientos por el financiamiento parcial de esta investigación a la Fundación UCV (FUCV) bajo el Proyecto No. 0297/2006 y al Vicerrectorado Académico de la Universidad del Zulia (LUZ).

## Bibliografía

- Albarrán J., González A., González O., Salazar E., Trujillo I. Fuchs M., y Torrealba M. 2009. Embriogénesis somática a partir de flores masculinas de Píneo Gigante y Cambur Manzano. *Agronomía Tropical* 59: 363-371.
- Arteaga M., García E., Vargas E. 2002. Embriogénesis somática a partir de flores masculinas en clones de banano. *Phyton* 68: 199-206.
- Bui V., Tran H. 2004. Crecimiento de las suspensiones celulares del cv "Cau man" *InfoMusa* 13: 2-4.
- Caboni E., Angeli D., Chiappetta A., Innocenti A., Van Onckelen H., Damiano C. 2002. Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 199-206.
- Côte F., Domergue R., Monmarson S., Schwendiman J., Teisson C., Escalant J. 1996. Embryogenic cell suspensions from male flower of *Musa AAA* cv. 'Grand naine'. *Physiologia Plantarum* 97: 285-290.
- Daniels D., Gómez R., Reyes M. 2002. Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar FHIA-21 (*Musa* sp., AAAB group). *In vitro Cell Developmental Biology-Plant* 38: 330-333.
- Escalant J., Teisson C., Côte F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro Cell Developmental Biology-Plant* 30: 181-186.
- Fedeagro. 2011. Estadísticas Agrícolas. En: <http://www.fedeagro.org/agricola/default.asp>. (Consultado el 07/06/2011).
- Filippi S., Appedazzato B., Rodríguez A. 2001. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. *Scientia Agricola* 58: 711-716.
- Georget F., Domergue R., Ferrière N., Côte F. 2000. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa AAA*, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Report* 19: 748-754.
- Grapin A., Ortíz J., Lescot T., Ferrière N., Côte F. 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 237-244.
- Houllou L., Kido E., Falco M., Silva M., Vargas A., Nogueira N., Lanzoni M., Tulman A. 2005. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 1081-1086.
- Jalil M., Chee W., Othaman R., Khalid N. 2008. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Scientia Horticulturae* 117: 335-340.
- Jalil M., Khalid N., Othman R. 2003. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv Mas (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 209-214.
- Kim Y., Moon H., Son S. 2006. Repetitive somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zizyphus jujuba* Mill. *In vitro Cell Developmental Biology-Plant* 42: 247-251.
- Komamine A. 2003. My way with plant cell cultures: significance of experimental systems in plant biology. *In vitro Cell Developmental Biology-Plant* 39: 63-74.
- Lerma S., Acuña P., Riveros A., Sandoval J. 2002. Tasa de multiplicación y potencial de regeneración de embriones somáticos de una suspensión celular de banano (*Musa AAA* cv. "Gran enano"). *InfoMusa* 11: 38-44.
- Martínez G., Delgado E., Pargas R., Manzanilla E., Ramírez H. 2007. Consideraciones generales sobre la producción y el comercio mundial de banano. I: producción, exportación e importación. Revista Digital CENIAP Hoy No. 13. <http://ceniap.gov.ve/pbd/revistastecnicas/ceniaphoy/index.htm>. (Consultado el 28/07/2011).
- Mikula A., Tykarska T., Zielińska M., Kuraś M., Rybczyński J. 2004. Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. *Acta Biológica Cracoviensia Series Botánica* 46: 109-120.
- Moghaddam B., Taha R. 2005. Cellular behavior in embryogenic and non-embryogenic sugar beet calluses. *In vitro Cell Developmental Biology-Plant* 41:465-469.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Namanya P., Magambo S., Mutumba G., Tushemereirwe W. 2004. Somatic embryogenesis from immature male inflorescences of East African highland banana cv. 'Nakyatengu'. *African Crop Science Journal* 12: 43-49.
- Navarro C., Escobedo R., Mayo A. 1997. *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 17-25.
- Pérez C. 2005. *Técnicas Estadísticas con SPSS 12. Aplicaciones al Análisis de Datos*. Madrid. Editorial Pearson Prentice Hall, Pearson Educación, S.A. 802 p.
- Pérez J., Rossel P. 2008. Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa AAA*, cv. 'Dwarf Cavendish') male flowers. *Plant Cell Report* 27: 965-971.
- Ramírez M., de García E. 2008. Obtainment of embryogenic cell suspensions from scalps of the banana CIEN BTA-03 (*Musa* sp., AAAA) and regeneration of the plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 11: 1-10.

- Ramírez M., de García, E., Finol, H. 2006. Ultraestructura de callos embriogénicos y no embriogénicos del banano Williams (AAA, *Musa* spp.). *Agronomía Tropical* 56: 615-620.
- Ramírez M., de García, E., Lindorf, H. 2008. Cambios morfoanatómicos en los ápices del vástago y de la raíz del banano Williams (AAA, *Musa* spp.) bajo distintas concentraciones de N6-benciladenina. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 92, 53-72.
- Strosse H., Domergue R., Panis B., Escalant J., Côte F. 2003. *Suspensiones de Células Embriogénicas de Banano y Plátano*. A. Vecina y C. Picq (eds). Guías Técnicas INIBAP No. 8. Red Internacional para el mejoramiento del banano y el plátano. Montpellier, Francia, p 31.
- Strosse H., Schoofs H., Panis B., Andre E., Reyniers K., Swennen R. 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Science* 170: 104-112.
- Trujillo I., García E. 1999. Somatic embryogenesis *in vitro* of *Musa* clones. *Phyton* 64: 7-17.
- Urbanek A., Zechmann B., Müller M. 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Styrian pumpkin*: cytological and biochemical investigations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 329-340.
- Urdaneta J., Valerio R., Vargas T. y de García E. 2006. Aspectos morfoanatómicos de callos originados durante el proceso de embriogénesis somática en banano Williams subgrupo Cavendish (*Musa* sp. grupo AAA). *Agronomía Tropical* 56: 697-703.
- Youssef M., James A., Mayo A., Ku J., Grijalva R. y Escobedo R. 2010. Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology* 9 (15): 2216-2223.