

Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano FHIA-18 (*Musa* spp. AAAB)

The effect of inoculum density on embryogenic cell suspension proliferation and differentiation in banana hybrid cultivar FHIA-18 (*Musa* spp. AAAB)

Luis A. Barranco Olivera¹, Rafael Gómez Kosky², Maritza Reyes Vega², Laisyn Posada Pérez², Marisol Frerie Seijo² y Idalia Herrera Ofarrill²

Resumen

La obtención de un sistema de regeneración eficiente por medio de la embriogénesis somática en las Musaceas, es hoy una gran herramienta ante los enormes problemas que presenta este género con el ataque de enfermedades como la sigatoka negra. El objetivo del trabajo es determinar las densidades celulares adecuadas para las etapas de multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas y formación de los embriones somáticos en medios de cultivo líquidos. Como material vegetal se usaron brotes inmaduros de la inflorescencia masculina de *Musa* AAAB, cv. FHIA-18. Los resultados demostraron que es posible el establecimiento de suspensiones celulares homogéneas a partir de embriones somáticos en etapa globular, y obtener los mayores volúmenes de biomasa celular al multiplicar dichas suspensiones con una densidad del 3% del volumen de células sedimentadas. A partir del decimoquinto día en el medio de cultivo de formación de embriones comenzaron a formarse estructuras compuestas por proembriones y embriones somáticos en etapa globular; entre las densidades estudiadas los mejores resultados se obtuvieron con 100 mgMF en la cual se formaron 1 871 ES.l⁻¹ con un peso de 248 mgMF.l⁻¹

Palabras clave: embrión somático, *Musaceas*, densidad celular.

Abstract

An extremely useful tool for dealing with the enormous problems involved in banana growing (*Musaceae*) caused by the attack of diseases such as black Sigatoka can be obtained today by ensuring an efficient regene-

1 Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Autor para correspondencia: e-mail: luisbo@uclv.edu.cu

2 Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní, Kk 5.5., Santa Clara., Cuba.

ration system via somatic embryogenesis. The work was aimed at defining appropriate cell densities for embryogenic cell suspension growth stages and somatic embryo formation in liquid culture medium. Immature male inflorescence buds from *Musa* AAAB cv FHIA-18 were used as vegetal material. The results showed that it is possible to establish homogeneous cell suspensions from somatic embryos in globular stage and obtain greater cell biomass volume by multiplying the suspension with 3% sedimented cell volume (density). Embryos began to form structures in culture medium consisting of globular stage somatic proembryos and embryos from the fifteenth day onwards. The best results amongst the densities studied were obtained with 100 mgMF, in which 1,871 ES.1 -1 were formed weighing 248 mgMF.1

Key words: Somatic embryo, *Musaceas*, cell density.

Recibido: abril 5 de 2009

Aprobado: noviembre 12 de 2009

Introducción

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) constituyen una importante fuente de alimentación a nivel mundial. La obtención de un sistema de regeneración eficiente por medio de la embriogénesis somática puede responder a dos objetivos: tener una técnica competitiva para la multiplicación masiva, y un sistema para el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética.

Distintos autores han hecho referencia al papel de la densidad de inoculación y su relación con el proceso de diferenciación, utilizando como especie modelo la zanahoria (*Daucus catorra* L.) (Osuga y Komamine, 1993; Osuga y Komamine, 1994; Shigeta *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos por todos estos autores evidencian que existe un efecto de autoinhibición del proceso embriogénico que está ligado a las elevadas densidades de inoculación, y que con anterioridad había sido descrito por Ozawa y Komamine (1989). La densidad de inóculo para el cultivo de células en suspensión varía para cada especie en particular, pero se ha demostrado que es uno de los parámetros de cultivo que determina el comportamiento de las suspensiones celulares.

Independientemente en muchos casos de la fase de desarrollo y la composición del medio de cultivo, generalmente ocurre que cuando se utilizan densidades de inoculación bajas se estimula el proceso de diferenciación de los agregados celulares y, por consiguiente, la formación y diferenciación de los embriones somá-

ticos, mientras que al emplear altas densidades de inoculación se favorecen las condiciones para la multiplicación de los agregados celulares (Merkle *et al.*, 1995).

En *Musa* no existen trabajos que traten el efecto de la densidad de inóculo en las diferentes etapas del proceso de embriogénesis somática. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar las densidades celulares adecuadas para las etapas de multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas y la formación de los embriones somáticos en medios de cultivo líquidos.

Materiales y métodos

Preparación del material vegetal

Como material vegetal se usaron brotes inmaduros de la inflorescencia masculina de *Musa* AAAB, cv. FHIA-18. Las inflorescencias se colectaron en el banco de variedades de la Empresa de Cultivos Varios "La Cuba", cuando se habían abierto diez brácteas después de la última flor femenina, y con la ayuda de un cuchillo se cortaron 10 cm antes del ápice y se eliminaron las brácteas, para reducirlas hasta un tamaño aproximado de 3 cm (figura 1).

Establecimiento de las suspensiones celulares

Los embriones somáticos para el establecimiento de las suspensiones celulares fueron ob-



Figura 1. Manejo realizado para la implantación *in vitro* de las inflorescencias. Tamaño final de la inflorescencia masculina antes de pasar el proceso de desinfección en el laboratorio para la obtención de las “manos” o grupos de flores inmaduras de donde se formaron los callos con estructuras embriogénicas.

tenidos por el método propuesto por Escalant *et al.* (1994) utilizando como explante inicial grupos de flores masculinas inmaduras. Se emplearon Erlenmeyers de 25 mL de volumen con 2-3 mL de medio de cultivo líquido propuesto por Côte *et al.*, (1996) para el establecimiento y la multiplicación de suspensiones celulares de bananos (M2); éste estaba compuesto por sales y vitaminas MS suplementado con 4,09 μM de biotina, 4,5 μM de 2,4-D, 680 μM de L-glutamina, 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ extracto de malta y 130 mM de sacarosa, el pH fue ajustado a 5,3 antes de la esterilización en autoclave. En cada Erlenmeyer se inocularon 150-200 mgMF de embriones somáticos y se colocaron en un agitador orbital modelo INFORS (HT), bajo condiciones de oscuridad, velocidad de 90 rpm y temperatura de $27\pm 0,2$ °C.

Para la determinación del crecimiento de las suspensiones celulares se utilizó el método del volumen de células sedimentadas (VCS) (Schoofs, 1997). Para ello las suspensiones celulares se adicionaron en tubos de ensayos cónicos de 15 mL, dejando decantar las células y posteriormente, con auxilio de una pipeta Pasteur, se llevaron a una concentración final del 25% en el tubo. A continuación las suspensiones se subcultivaron en Erlenmeyers de 100 ó 250 mL con 15 ó 25 mL de medio de cultivo, respectivamente, se mantuvo una concentración final de células del 3%. Los subcultivos se realizaron cada 13 días.

Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares

Se evaluaron cuatro densidades de células (2, 3, 4 y 5% de VCS) respecto al volumen total de trabajo (10 mL de medio de cultivo), cada una compuesta por tres Erlenmeyers de 50 mL de volumen total.

El medio de cultivo y las condiciones experimentales fueron iguales a lo descrito para el establecimiento de las suspensiones celulares. El medio de cultivo no se renovó durante los 21 días que duró el experimento.

Para la confección de las curvas de crecimiento celular se procedió de la siguiente forma: cada tres días, durante 21 días, con la ayuda de pipetas Pasteur se extrajo todo el contenido de los Erlenmeyers y se colocó en tubos cónicos, se dejó decantar durante cinco minutos y se midió el volumen que ocupaban las células sedimentadas. Para el análisis de los datos se utilizó el paquete de ajuste de curvas *CURVE EXPERT* 1.3 versión 96-97.

Formación de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido

Se evaluaron cuatro masas frescas de agregados celulares (50, 100, 250 y 500 mgMF)

en 25 mL del medio de cultivo líquido propuesto por Côte *et al.* (1996) para determinar la influencia de la densidad inicial de los agregados celulares sobre la formación de los embriones somáticos en etapa globular. Se realizaron las evaluaciones a los 15 y 30 días de cultivo para determinar el número de embriones somáticos por litro de medio de cultivo (ES. L^{-1}) y a los 30 días el peso de la masa fresca.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete de ajuste de curvas *CURVE EXPERT* 1.3. versión 96-97, y el paquete estadístico *SSPS* versión 9.0 con un Anova de clasificación simple.

Resultados y discusión

Establecimiento de las suspensiones celulares

A partir de embriones somáticos en etapa globular (figura 2), obtenidos de los callos formados de las flores masculinas inmaduras en medio de cultivo semisólido, se establecieron suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB).

A los 15 días de cultivo de las suspensiones celulares establecidas se observaron células embriogénicas pequeñas, esféricas, con un contenido citoplasmático denso, gránulos de almidón y algunos agregados embriogénicos.

Similares resultados reportan Grapin *et al.* (1996) en el cultivar *French Sombre* (AAB), los cuales transfirieron callos friables a un medio líquido y establecieron suspensiones celulares heterogéneas constituidas por agregados celulares, proembriones, nódulos y células aisladas.

Escalant *et al.* (1994) y Côte *et al.* (1996), establecieron suspensiones celulares a partir de flores masculinas en el banano cv. Gran Enano (AAA), caracterizadas por una gran cantidad de agregados celulares y proembriones.

Las suspensiones celulares en la fase de multiplicación estaban compuestas por un gran número de células esféricas en división activa, agregados celulares heterogéneos e irregulares, translúcidos y no translúcidos. Las características celulares anteriormente mencionadas se consideran como un indicativo de la condición embriogénica de las suspensiones celulares (Williams y Maheswaran, 1986). Con la observación periódica bajo microscopio óptico de las suspensiones celulares se comprobó que tuvieron cambios en su composición celular, predominando los agregados celulares. Estos agregados embriogénicos llegaron a ocupar entre 90 y 95% de la suspensión, y su tamaño varió entre 80 y 300 μm , formándose una suspensión celular homogénea. También disminuyó la cantidad de células aisladas y parenquimatosas prácticamente a valores ínfimos a medida que se fueron realizando los subcultivos a las suspensiones celulares.

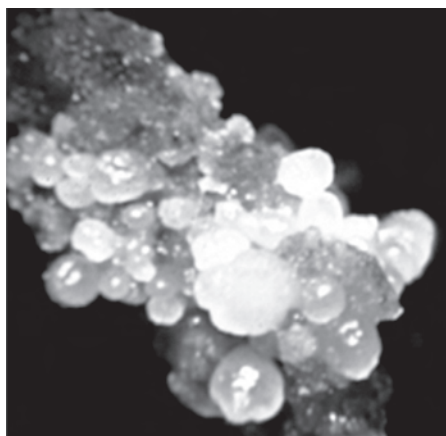


Figura 2. Embriones somáticos en etapa globular a los 5 meses de cultivo.

Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares

Como se muestra en la figura 3, inicialmente se observó una fase de reposo o latencia. Durante esta etapa las células se adaptan a las nuevas condiciones de cultivo para posteriormente iniciar e incrementar la velocidad de la división celular durante la fase exponencial.

La densidad del 3% del VCS mostró una fase de crecimiento exponencial bien definida y continua. En la misma las células son jóvenes y biológicamente activas alcanzando su máxima tasa de división. Si se realiza el subcultivo durante este periodo de crecimiento, las células se mantendrán siempre en multiplicación continua y sin pasar a la fase lineal. En esta densidad se produjo el mayor incremento de la biomasa celular con 0,35 mL de VCS.

En las densidades de 2, 4 y 5% del VCS, se extendió la fase de latencia o reposo, y en las curvas no se observó una fase exponencial definida, lo que pudo ser provocado por el empleo de densidades celulares no adecuadas. Según Street (1977), una de las causas de la pobre multiplicación de los agregados celulares es la escasez o el exceso de precursores metabólicos primarios de este proceso, que precisamente son incorporados al medio de cultivo por las propias células vegetales. Es por ello que se debe determinar la densidad mínima efectiva o, lo que es igual, la concentración crítica de células en el medio de cultivo para poder mantener el crecimiento celular.

Para cada densidad celular se calculó el punto de inflexión durante la etapa de crecimiento exponencial, el cual coincide con el momento máximo en que debe realizarse el subcultivo de la suspensión celular. Para la densidad de 2% de VCS el subcultivo debió realizarse a los 13 días, para el 3% de VCS a los 15 días, para el 4% de VCS a los 7 días, y para 5% de VCS a los 5 días.

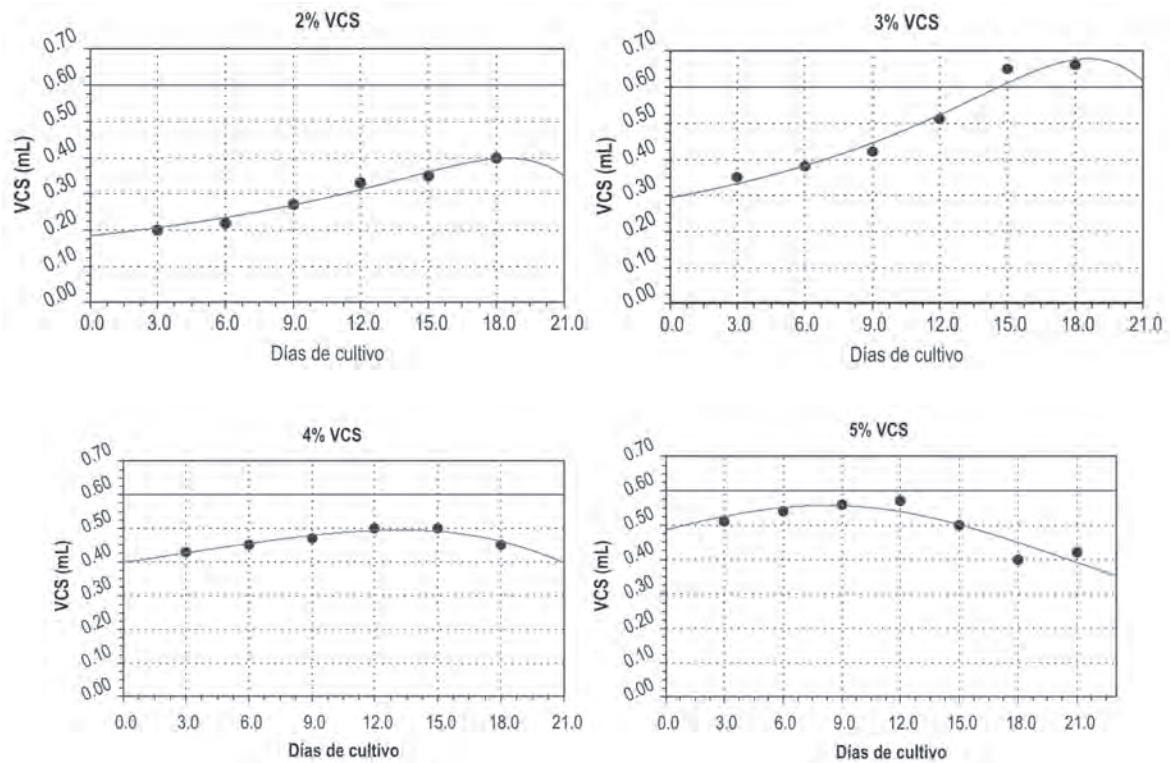
En la fase de disminución progresiva el alto número de células determina que se acu-

mulen los desechos del metabolismo celular, el pH se modifique, la transferencia de energía disminuya y las células se obstaculicen mutuamente, y la velocidad de división disminuya gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria que puede coincidir con el momento en que se hayan agotado los nutrientes, o al menos algunos de ellos. Durante esta fase las células han alcanzado su máxima densidad permisible (Vasil y Vasil, 1982).

Durante el crecimiento de las suspensiones de células del cv. 'Cau man', Trang y Thanh (2004) observaron una curva de crecimiento sigmoideal que se caracterizó por un periodo de crecimiento lento hasta el séptimo día, y luego un periodo de rápido crecimiento entre el séptimo y 21 días. También López (2007), a partir de suspensiones establecidas de embriones somáticos obtenidos del cultivo de callos con estructuras embriogénicas a partir de yemas axilares en el cv. De plátano Navolean (AAB), alcanzó en la densidad de 6,0% de VCS que las células duplicaran su volumen celular inicial a los 5 días de cultivo y al emplear 9% de VCS no se llegó a duplicar el volumen inicial celular. El autor, refiere que esto pudo ser provocado por el empleo de volúmenes celulares no adecuados para la multiplicación de los cultivos celulares.

Las células mostraron una elevada vitalidad durante el periodo de crecimiento exponencial, los valores oscilaron entre 90 y 95%. Después del momento definido como el máximo para el subcultivo se comenzaron a observar células alargadas y con escasos gránulos de almidón, lo cual está dado por la disminución de nutrientes y reguladores del crecimiento en el medio, fundamentalmente el 2,4-D, cuya ausencia causa agrandamiento de las células y vacuolación (Niubó *et al.*, 2000).

El momento adecuado para realizar el subcultivo de las suspensiones celulares no puede coincidir con la máxima expresión de la densidad celular del cultivo en suspensión, ni con el momento en que se agotan las principales fuentes de energía, sino con la última fase de crecimiento exponencial del cultivo.



VCS	R	S	A	b	C	d
2%	0,9887	0,0153	0,1848	-	-	0,00157
				-0,0074	-0,0767	
3%	0,9898	0,0269	0,2937	-	-	0,0016
				-0,0108	-0,0770	
4%	0,9827	0,0096	0,3980	-	-	0,0096
				-0,0012	-0,0011	
5%	0,9075	0,0034	0,4865	-	-	0,0018
				-0,0041	-0,0386	

Figura 3. Influencia de las densidades celulares en la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares del cultivar híbrido de banana FHIA-18 (AAAB) durante 21 días de cultivo.

Sobre esta base se puede establecer que 3% del VCS es una densidad de inoculación que favorece la multiplicación de las suspensiones celulares del cultivar FHIA-18, bajo las condiciones de manejo y cultivo previamente explicadas, debiendo realizarse los subcultivos cada trece días para mantener la calidad de las suspensiones en multiplicación.

Formación de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido

A partir del décimo quinto día de cultivo comenzaron a formarse estructuras de apariencia arenosa compuestas por proembriones y embriones somáticos en etapa globular en la

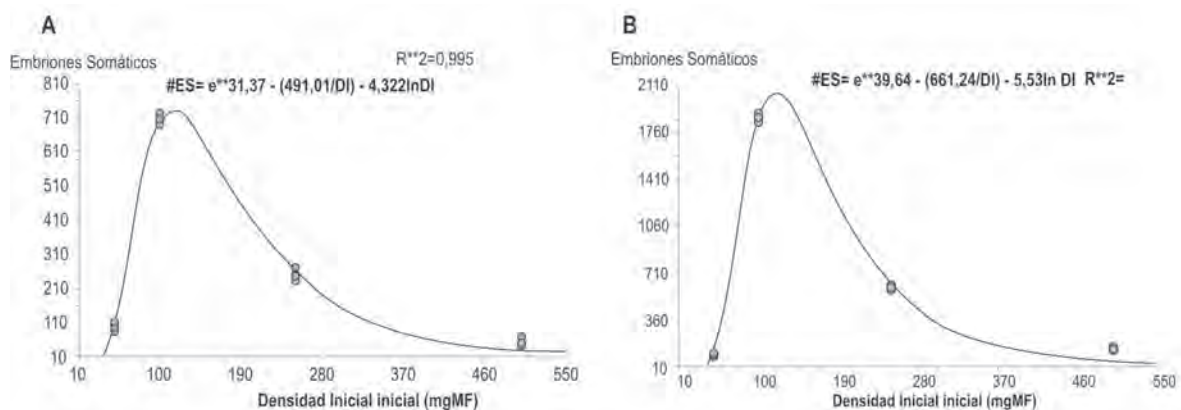


Figura 4. Efecto de la densidad de inóculo en el número de embriones somáticos por litro de medio de cultivo en el cultivar híbrido de banano FHIA-18 (AAAB): A. 15 días de cultivo y B. 30 días de cultivo.

base del Erlenmeyer, con el medio de cultivo de formación de embriones somáticos.

Los mejores resultados para la formación de los embriones somáticos en medio líquido se lograron con la densidad de inóculo inicial de 100 mgMF con $704 \pm 6,71$ y $1\ 871 \pm 9,32$ ES. L^{-1} , los cuales se encontraban en su mayoría en etapa globular después de 15 y 30 días de cultivo, respectivamente. En el análisis del ajuste de la curva se pudo determinar que este fue el tratamiento más cercano al punto de máxima respuesta teórica —119,5 mgMF—, coincidiendo con el pico de la curva (figura 4).

En las suspensiones con densidad de 50 mgMF de células sólo se formaron $97,25 \pm 9,32$ ES. L^{-1} , y hubo muy poco incremento de la biomasa. En el tratamiento con 500 mgMF se observó un aspecto similar al de las suspensiones en etapa de multiplicación, manteniendo indiferenciados los agregados embriogénicos.

El mayor aumento de la biomasa durante la etapa de formación de embriones somáticos se logró también con la densidad de inoculación de 100 mgMF con un promedio de $248 \pm 4,99$ mgMF. L^{-1} . El punto de máxima respuesta teórica estuvo en los 117,5 mgMF. En el tratamiento con 500 mgMF se obtuvieron

solo $46,59 \pm 4,99$ mgMF. L^{-1} coincidiendo con el tratamiento de menos embriones somáticos formados. La inhibición en la formación de los embriones somáticos en este tratamiento de 500 mgMF puede ser debida a varias razones; una de ellas es la acumulación en el medio de cultivo de moléculas inhibitorias del proceso de diferenciación como son las glicoproteínas extracelulares descritas por De Vries *et al.* (1988), o un desbalance en el medio de cultivo entre los niveles de elementos inhibitorios que han sido secretados por la célula al medio de cultivo y de cuyo balance depende la embriogénesis somática (De Jong *et al.*, 1992). También puede ser explicado por la acumulación de gases volátiles como el dióxido de carbono y etileno en suspensiones embriogénicas cultivadas con alta densidad (Shimazu y Kurata, 1999).

Daniels (2003) señaló la formación de $799,5 \pm 3,8$ embriones somáticos en el medio de cultivo propuesto por Bieberach (1995) con una densidad celular de 20% (VCS) en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa sp.* AAAB), pero en medio de cultivo en estado semisólido. Todo lo anterior confirma la influencia del genotipo y el número de agregados celulares embriogénicos en la suspensión celular en la cantidad de embriones somáticos por formarse.

Aunque algunos autores como Georget *et al.* (2000) hacen referencia a que el desarrollo de células embriogénicas en proembriones a partir de suspensiones celulares embriogénicas en medio de cultivo líquido en el banano cultivar Grande naine (AAA) es bajo, destacan que dentro de las señales que resultan en la formación de los embriones somáticos la densidad celular es de gran importancia.

A partir de los resultados alcanzados durante la etapa de formación de los embriones somáticos se establece como condición de cultivo iniciar el proceso de histodiferenciación con 100 mgMF de agregados celulares en medio de cultivo líquido.

Conclusiones

El mayor incremento de la biomasa de las suspensiones celulares durante la fase de multiplicación se alcanzó con el 3% del VCS como densidad de inóculo.

Empleando 100 mgMF como densidad de inóculo se logró iniciar el proceso de histodiferenciación y formar la mayor cantidad de embriones somáticos en etapa globular.

Referencias bibliográficas

- Bieberach, C. 1995. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa spp.* Tesis para optar al grado de *Magister Scientiae*. Catie, Turrialba, Costa Rica. p. 86.
- Côte, F., Domergue, R., Monmarson, S., Schwendiman, J., Teisson C., Escalant, J. V. 1996. Embryogenic cell suspensions from male flower of *Musa* AAA cv. 'Grand Naine'. *Physiol Plant* 97: 285-290.
- Daniels, D. D. 2003. Desarrollo de la embriogénesis somática y su empleo en la transformación genética por biobalística en el cultivar híbrido de plátano "FHIA-21" (*Musa spp.* AAAB). Ph. D. Tesis, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. p. 96.
- De Jong, A., Cordewener, J., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., Van Kammen, A., De Vries, S. 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 4: 425-433.
- De Vries, S., Booij, H., Cordewener, J., Van Angelen, F., De Jong, A., Van Kammen, A., Lo Schiavo, F., Schellekens, G., Sterk, P., Terzi, M. 1988. Carrot somatic embryogenesis suspends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes and Development* 2: 462-476.
- Escalant, J. V., Teisson, C., Cote, F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa spp.*). *In Vitro Cell Dev Biol* 30: 181-186.
- Georget, F., Cote, F., Domergue, R., Ferrière, N. 2000. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. 'Grande naine') embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports* 19: 748-754.
- Grapin, A., Schwendiman, J., Teisson, C. 1996. Somatic embryogenesis in banana plant. *In Vitro Cell Dev Biol* 32: 66-71.
- Merkle, S., Parrott, W., Flinn, B. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (ed.), *In Vitro Embryogenesis in plants*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 155-203.
- Niubó, E., Maribona, R., Sánchez, C. 2000. Caracterización morfológica de una línea celular de caña de azúcar. *Revista Cenic Ciencias Biológicas* 31 (3): 173-176.
- López, J. T. 2007. Nueva metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'Navolean' (*Musa spp.*, grupo AAB). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Inivit, Cuba. 98 pp.
- Osuga, K., Komamine, A. 1993. Cell density is an important factor for synchronization of the late stage of somatic embryogenesis at high frequency. *Plant Tissue Culture Letters* 10 (2): 180-182.
- Osuga, K., Komamine, A. 1994. Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell culture systems. *Int J Dev Biol* 38: 287-299.
- Ozawa, K., Komamine, A. 1989. Establishment of a system of high frequency embryogenesis from long-term cell suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 77: 205-211.
- Schoofs, H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thesis Ph. D. K.U. Leuven, Belgium. p. 257.
- Shigeta, J., Sato, K., Mii, M. 1996. Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science* 115:109-114.