



Tesis de Diploma

Embriogénesis somática en el cultivar
'FHIA – 25' (*Musa* spp., Grupo AAB) a
partir de ápices meristemáticos

Dayana Rodríguez González

Santa Clara, 2013



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOVIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Tesis de Diploma

**Embriogénesis somática en el cultivar 'FHIA – 25'
(*Musa* spp., Grupo AAB) a partir de ápices
meristemáticos**

Dayana Rodríguez González

Tutor: Dr.C. Jorge López Torres*
Consultante: M.Sc. Aymé Rayas Cabrera*

Santa Clara, 2013

*Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara. E-mail: jlopez@inivit.cu

RESUMEN

La embriogénesis somática representa un sistema útil para la mejora genética y una vía alternativa para la propagación *in vitro* de plantas. El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer una metodología de regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares, en medio de cultivo líquido en el cultivar de plátano 'FHIA-25' (AAB), el que posee excelente rendimiento y alta resistencia a "Sigatoka negra", pero con la limitante del bajo contenido de azúcar en su fruto, lo cual hace que sea necesario disponer de un método de regeneración de plantas a nivel celular como la embriogénesis somática que puede facilitar la mejora de la calidad del fruto mediante la transformación genética. Se demostró que es posible la obtención de suspensiones celulares embriogénicas homogéneas a partir del explante antes mencionado, directamente en el medio de cultivo líquido sin pasar por una fase de callo, donde se lograron los mayores volúmenes de multiplicación celular a la densidad de 3,0% del volumen de células sedimentadas. La incubación de los embriones somáticos producidos durante 30 días en el medio de cultivo de maduración de embriones permitió incrementar la germinación de los mismos. Las plantas provenientes de los embriones somáticos, en comparación con las plantas regeneradas por organogénesis, mostraron en ambos casos un alto porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatización, sin la presencia de cambios fenotípicos.

Palabras claves: embrión somático, plátano, suspensiones celulares embriogénicas.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a useful system for genetic improvement and an alternative for *in vitro* plant propagation. This work was performed with the aim of establishing a plant regeneration method via somatic embryogenesis using initial explants of shoot apices from axillary buds in liquid culture medium. The high yielding banana cultivar 'FHIA – 25' (AAB) which has a high resistance to "Black Sigatoka", but low sugar content in the fruit was used. So, there is a need to have a plant regeneration method at cellular level such as, somatic embryogenesis that may help improve the fruit quality by genetic transformation. It proved to be possible to obtain homogeneous embryogenic cell suspensions from explants mentioned above directly in the liquid culture medium without going through a callus phase where the highest cellular multiplication volumes were achieved at 3,0% density of the sedimented cell volume. The incubation of somatic embryos produced during 30 days in the maturation culture medium permitted a germination increment. Plants from somatic embryos compared to plants regenerated by organogenesis, showed in both cases a high survival percentage in the acclimatization phase, without the presence of phenotypic changes.

Keywords: embryogenic cell suspensions, plantain, somatic embryo.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Generalidades del cultivo del plátano (<i>Musa</i> spp)	3
2.1.1. Origen	3
2.1.2. Sistemática y botánica	4
2.2. Cultivar de plátano 'FHIA-25' (AAB).....	4
2.3. Embriogénesis somática	6
2.3.1. Generalidades.....	6
2.3.2. Factores relacionados con la embriogénesis somática.....	7
2.3.2.1. Influencia del genotipo	8
2.3.2.2. El tipo y estado fisiológico del explante.....	8
2.3.2.3. Condiciones de cultivo e influencia del medio de cultivo.....	9
2.3.3. Desarrollo de la embriogénesis somática	10
2.3.3.1. Inducción de la embriogénesis somática	11
2.3.3.2. Establecimiento y mantenimiento de células en suspensión	13
2.3.3.3. Formación de los embriones somáticos.....	14
2.3.3.4. Maduración de los embriones somáticos	16
2.3.3.5. Germinación y conversión en plantas	17
2.4. Embriogénesis somática en <i>Musa</i> spp.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes de yemas axilares	24
3.2. Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas	25
3.3. Formación de los embriones somáticos.....	26
3.4. Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación.....	27
3.5. Conversión a plantas de los embriones somáticos	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes de yemas axilares	30

4.2. Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas	32
4.3. Formación de los embriones somáticos.....	35
4.4. Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación.....	36
4.5. Conversión a plantas de los embriones somáticos	38
5. DISCUSIÓN	39
5.1. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes de yemas axilares	39
5.2. Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas	40
5.3. Formación de los embriones somáticos.....	42
5.4. Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación.....	44
5.5. Conversión a plantas de los embriones somáticos	46
5. CONCLUSIONES	49
6. RECOMENDACIONES.....	50
7. LITERATURA CITADA	

1. INTRODUCCIÓN

Los bananos (*Musa spp.*) constituyen una fuente importante de alimento para gran parte de la población mundial, se cultivan en el mundo más de cinco millones de hectáreas con una producción anual de 106 541 709 toneladas (FAO, 2013).

En Cuba, se producen anualmente unas 250 000 toneladas (FAO, 2013) y su cultivo contribuye a lograr la estabilidad de productos alimentarios en el mercado, debido a su capacidad de producir durante todos los meses del año, sus arraigados hábitos de consumo, así como su diversidad de usos (Rodríguez, 2000).

Sin embargo, la aparición en el país en noviembre de 1990 de la enfermedad conocida como “Sigatoka negra”, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, afectó severamente las áreas dedicadas a la “siembra” de plátanos y bananos susceptibles a esta enfermedad, las que fueron reemplazadas progresivamente por otros cultivares (Sánchez *et al.*, 2002). Una opción para este problema ha sido la introducción de híbridos de bananos y plátanos más resistentes o tolerantes a la “Sigatoka negra”, procedentes de la Federación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) y, dentro ellos, el cultivar de plátano (AAB) ‘FHIA-25’ con excelente rendimiento y altamente resistente a “Sigatoka negra”, pero con la limitante del bajo contenido de azúcar que su fruto posee, lo cual hace que sea necesario disponer de un método de regeneración de plantas a nivel celular, como la embriogénesis somática, que facilite mejorar la calidad del fruto mediante la transformación genética (Kamle *et al.*, 2011).

La embriogénesis somática (ES) es la formación de un embrión a partir de una célula o grupos de ellas, que no es producto de la fusión de gametos (Merkle *et*

al., 1995) y la misma se fundamenta en la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad para formar plantas completas (Steward *et al.*, 1958).

La embriogénesis somática constituye una herramienta auxiliar para la mejora genética de los bananos (Perea, 2001; Escalant y Jain, 2004), además de permitir obtener producciones superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual hace que este método sea potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Ibaraki y Kurata, 2001). Tomando en consideración los antecedentes descritos, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: “Es posible regenerar plantas del cultivar de plátano ‘FHIA – 25’ (AAB) por embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares en medio de cultivo líquido en agitación”.

Para validar esta hipótesis de trabajo, se propuso como objetivo general:

Establecer una metodología de regeneración de plantas vía embriogénesis somática en el cultivar ‘FHIA – 25’ a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares en medio de cultivo líquido.

Objetivos específicos:

1. Establecer suspensiones celulares embriogénicas a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares en medio de cultivo líquido sin pasar por una fase de callo.
2. Multiplicar las suspensiones celulares embriogénicas establecidas.
3. Regenerar plantas a partir de los embriones somáticos obtenidos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del cultivo del plátano (*Musa spp*)

2.1.1. Origen

El cultivo de musáceas se remonta desde 400 años antes de Cristo, según los hallazgos de evidencia en petrolitis encontrada en el lugar de Reber, Rakival Lapita en Watson Island Papua, New Guinea (Lentfer, 2004).

El centro de origen del género *Musa* es el sureste de Asia incluyendo a Malasia e Indonesia, tanto de *Musa balbisiana* como de *Musa acuminata*, cuyos cruzamientos dieron lugar a todos los cultivares comestibles conocidos en América (Belalcázar, 1991), es el subcontinente indio un centro principal para la hibridación (Daniells *et al.*, 2001) y domesticación como resultado de mutaciones en las especies silvestres, de las cuales se obtiene una producción de plantas con frutos comestibles y sin semillas (Daniels, 2003). Los diploides comestibles de *M. balbisiana* experimentaron una evolución paralela en partes más secas de la India, Myanmar, Tailandia y Filipinas, los cuales aportaron rasgos como el vigor, tolerancia a la sequía y resistencia a las enfermedades (Pillay *et al.*, 2000). Mientras que los cultivares de *M. acuminata* (resultado del movimiento humano de los cultivares) se encontraban mejor adaptados a zonas húmedas (Daniells *et al.*, 2001).

En cuanto a su introducción en América, el cronista Oviedo sostiene que el plátano fue llevado desde la Gran Canaria a Santo Domingo por Fray de Berlanga en 1516 y de ahí a Cuba (López, 1989).

2.1.2. Sistemática y botánica

Los plátanos son plantas herbáceas, con un falso tallo de forma cilíndrica formado por las vainas de las hojas superpuestas, un cormo y un sistema radical fibroso. La inflorescencia es terminal y crece a través del centro del pseudotallo hasta alcanzar la superficie (López, 1989). Pertenecen a la clase de las monocotiledóneas, al orden *Zingiberales* y a la familia *Musaceae*, la cual incluye a los géneros *Musa* y *Ensete*. El género *Musa* se divide en cuatro secciones (*Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Emusa*), además de los híbridos formados entre especies de este género (*Eumusa* x *Australimusa*) (Daniells *et al.*, 2001). La sección *Eumusa* contiene la mayoría de los bananos y plátanos comestibles y se admite que esta serie de poliploides se derivan de las dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla, de donde provienen las designaciones AA (*acuminata*), BB (*balbisiana*), ambas con número cromosómico $2n=22$. Dentro de su evolución genética, un paso importante para el surgimiento de los bananos comestibles fue el desarrollo de la partenocarpia, que unido a la esterilidad de las semillas, dieron origen a los cultivares diploides comestibles de *M. acuminata* (AA). Luego, a partir de los cultivares AA, debido a la restitución cromosómica en su meiosis, surgieron los triploides AAA. Del cruzamiento entre los cultivares AA y AAA, con la especie silvestre *M. balbisiana* (BB), surgieron los híbridos AB, AAB, ABB, AAAB y AABB (Osuji, 1997).

2.2. Cultivar de plátano ‘FHIA-25’ (AAB)

El cultivar híbrido de plátano ‘FHIA – 25’ (*Musa* spp. AAB) fue desarrollado por la Federación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), y constituye una excelente alternativa alimenticia por su elevado potencial productivo, bajos costos

de producción y altos niveles de resistencia a la “Sigatoka Negra”, al ataque de *Fusarium oxysporum* (“Mal de Panamá”) y nemátodos (*Radopholus similis*) (FHIA, 2002).

Origen: FHIA, Honduras, Centro América

- Nombre del mejorador: Phillip Rowe Ray
- Año de generación: 1995
- Linaje: SH-3648 x SH-3142
- Genoma/Ploidía: AAB
- Uso: Consumo procesado (hervido o frito, verde o maduro)

Características de la planta:

Morfológicas:

- Hábito foliar: decumbente
- Apariencia del pseudotallo: brillante
- Altura: 2,5 y 3,0 m
- Tipo de bellota: normal (presente permanentemente)
- Forma de racimo: cilíndrico
- Posición del racimo: vertical
- Color de fruto: verde claro
- Forma de fruto: rectos o con curva poco marcada

Fenológicas:

- Duración del primer ciclo vegetativo (plantación a floración): 250 – 300 días
- Duración primer ciclo productivo (fructificación a cosecha): 120 – 150 días
- Días transcurridos de la plantación a segunda floración: 400 – 450 días

Producción:

- Peso neto (sin raquis) de racimo: 38 – 45 kg
- Número de dedos por racimo (sin desmane): 246 – 274 dedos
- Peso dedos individuales: 100 – 150 g
- Reacción a enfermedades:
 - “Sigatoka negra”: Altamente resistente
 - “Mal de Panamá”: Resistente
 - Nemátodos: Resistente a *Pratylenchus coffea*

2.3. Embriogénesis somática

2.3.1. Generalidades

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula o grupos de ellas, que no es producto de la fusión de gametos (Merkle *et al.*, 1995).

La embriogénesis somática se fundamenta en la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad para formar plantas completas (totipotencia), propuesta por Haberlandt en 1902, citado por Steward *et al.* (1958) y Reinert (1958), quienes dieron crédito por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática aunque había sido descrita previamente por Strasburges en 1878.

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote) capaz de originar una planta completa. Según Sannasgala (1989) y Escalant y Teisson (1989), el embrión somático presenta las siguientes características:

- Es una estructura bipolar con un ápice radical, uno apical y cotiledones.

- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que puede ser separado fácilmente de este.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

La embriogénesis somática ha surgido como una nueva vía de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Perea, 2001) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2011). Este método es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión y a la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo (Preil, 1991). Además, se obtienen altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales (Kamle *et al.*, 2011).

Según Strosse *et al.* (2003) esta técnica se basa en el uso de reguladores sintéticos de crecimiento (auxinas) para inducir la desdiferenciación de los tejidos y formación del tejido embriogénico (callo). El callo proporciona el material de inicio para el desarrollo de suspensiones de células embriogénicas (SCE), a partir de estas suspensiones, se forman los embriones somáticos y su posterior conversión a plantas.

2.3.2. Factores relacionados con la embriogénesis somática

Los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores, que en algunos casos favorecen y en otros dificultan los manejos *in vitro* del material (Gómez, 1998). Dentro de ellos se encuentran:

- El genotipo de la planta

- El tipo y estado fisiológico del explante
- Los reguladores del crecimiento
- Las condiciones de cultivo

2.3.2.1. Influencia del genotipo

Los diferentes genotipos dentro de una misma especie, pueden variar en su capacidad de respuesta embriogénica, tales diferencias genotípicas podrían reflejar la activación o no de los mismos, elementos claves necesarios para que se desarrolle la embriogénesis somática (Merkle *et al.*, 1995).

Escalant *et al.* (1994), señalaron que los bananos y plátanos tienen una respuesta embriogénica muy variable a menudo extremadamente baja, aún cuando las flores sean recolectadas en la estación correcta.

No solo la respuesta embriogénica depende del genotipo y del cultivo, también diferentes clones pueden comportarse de manera diferente e incluso existe una gran variedad entre los experimentos (Schoofs *et al.*, 1999), al respecto, otros autores han corroborado la dependencia del genotipo en otros cultivos estudiados (Baker *et al.*, 1995).

2.3.2.2. El tipo y estado fisiológico del explante

La selección del explante puede ser un factor fundamental que determina el fracaso o el éxito de un protocolo embriogénico (Krishnaraj y Vasil, 1995; Viñas y Jiménez, 2011).

Sin embargo, Strosse *et al.* (2003) afirmaron que el principal problema de utilizar los bananos comestibles (sin semillas) consiste en que las células embriogénicas deben ser iniciadas de los tejidos diferenciados, por esto es necesario el proceso

de desdiferenciación a partir de varios explantes (flores o escalps) para obtener un callo con estructuras embriogénicas de buena calidad. Independientemente del explante utilizado, la edad de este tiene un rol importante en la determinación de la respuesta *in vitro*, muy viejos y muy jóvenes no son apropiados. De manera, que los ápices han sido ampliamente utilizados con buenos resultados en varias especies de plantas (Cantliffe *et al.*, 1988; Krishnaraj y Vasil, 1995; Krikorian y Scott, 1995; López, 2006).

2.3.2.3. Condiciones de cultivo e influencia del medio de cultivo

Al variar las condiciones de cultivo (estrés), pudiera ser factible abolir o atenuar la adecuada expresión genética y activar las bases para el desarrollo de la embriogénesis somática. Basado en esto, se han empleado varias técnicas para inducir dicho proceso, como: calor, aumento de la concentración de iones de hipoclorito, anaerobiosis, bajas temperaturas (4°C), altas presiones osmóticas y también la exposición a la auxina (Merkle *et al.*, 1995).

El medio de cultivo más utilizado para la embriogénesis somática es el MS (Murashige y Skoog, 1962) o su modificación (Evans *et al.*, 1981).

Wetherell (1984), demostró que es posible aumentar el potencial embriogénico de los callos de zanahoria, exponiéndolos a niveles altos de sacarosa o de manitol; la sacarosa normalmente se usa en concentraciones de 20; 30 y hasta 120 g.L⁻¹.

Las poliaminas, incorporadas a los cultivos embriogénicos de zanahoria, inhiben el desarrollo de los embriones somáticos y los subcultivos. En cambio, un medio de cultivo libre de poliaminas, pero que contenga arginina, permite el desarrollo normal del embrión (Bradley *et al.*, 1984).

La concentración usual de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) está dentro del rango de 0,11 a 6,10 mg.L⁻¹ (Evans *et al.*, 1981), aunque se deben usar concentraciones más altas, en caso de que el carbón activado se incorpore al medio de cultivo (Reynolds y Murashige, 1979).

El papel de las citoquininas en el medio de cultivo primario o inductor del embrión es menos claro, aunque normalmente este incluye una de ellas. Fujimura y Komamine (1980) han sugerido que las citoquininas pueden ser esenciales para la maduración y la germinación de los embriones somáticos.

El uso de inhibidores del crecimiento, tales como el ácido abscísico (ABA), reduce la frecuencia de aparición de anomalías del desarrollo, tales como la formación de policotiledones y la germinación precoz del embrión y contribuye a la maduración y sincronización de los embriones (Ammirato, 1973; 1974).

2.3.3. Desarrollo de la embriogénesis somática

Según Parrott (1993), la embriogénesis somática se desarrolla a través de las fases siguientes:

- Inducción de la embriogénesis somática
- Establecimiento y mantenimiento de células en suspensión
- Formación de embriones somáticos
- Maduración de los embriones somáticos
- Germinación y conversión en plantas

2.3.3.1. Inducción de la embriogénesis somática

Las auxinas han resultado ser las más eficientes para la inducción de la embriogénesis somática y dentro de ellas, el 2,4-D. El tipo y concentración necesaria depende de la especie y el explante (Merkle *et al.*, 1995).

Bajo la exposición al 2,4-D, son observados cambios ultraestructurales que acompañan la actividad meristemática, entre ellos: la fragmentación de la vacuola, el incremento de la biosíntesis del almidón y el número de orgánulos y cuerpos lipídicos decrecen drásticamente en las células activadas. El citoplasma adquiere un aspecto denso y con núcleo central prominente. La subsiguiente división mitótica en estas células permite la formación de grupos embriogénicos (Yeung, 1995).

El término de células embriogénicas es específico para aquellas células que han completado la transición de un estado somático a uno en el cual no son necesarios más estímulos exógenos aplicados (tales como los reguladores de crecimiento), para producir embriones somáticos (De Jong *et al.*, 1993).

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen del tipo de células que formen el tejido del explante: células somáticas determinadas preembriogénicamente (CsDPE) o células somáticas no embriogénicas (CsNE) (Merkle *et al.*, 1995). En el primer caso (CsDPE), un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de embriones somáticos a partir del tejido del explante. Este proceso es llamado embriogénesis somática directa, donde las células del explante primario son la fuente de los embriones somáticos.

Cuando las células somáticas presentes no son embriogénicas, deben sufrir varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina, durante la inducción del estado

de célula embriogénica. Estas divisiones mitóticas dan lugar a un callo y el proceso es llamado embriogénesis somática indirecta (Merkle *et al.*, 1995).

Según Vasil (1988), el callo puede ser identificado por sus características morfológicas y citológicas; de apariencia compacta, superficie nodular, color blanco amarillo pálido y con cierto aspecto organizado. El mismo se encuentra rodeado frecuentemente por un callo no embriogénico, friable y semitraslúcido. En otros casos, se observan porciones de callos embriogénicos distribuidos al azar en la superficie del callo no embriogénico.

La parte embriogénica del callo crece de forma más lenta que el callo no embriogénico y puede ser mantenida en cultivo por largos períodos de tiempo, mediante la selección cuidadosa y el subcultivo de los sectores embriogénicos.

Dentro de la embriogénesis somática indirecta, existen dos tipos, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (Gómez, 1998). En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos y se desarrollan completamente a través de las diferentes etapas de desarrollo del embrión; mientras que en la segunda (embriogénesis somática de alta frecuencia), los embriones somáticos aparecen entre las 16 y 20 semanas de cultivo, en un número menor de callos, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mayor. Otra forma de embriogénesis indirecta la constituyen los cultivos de suspensiones celulares (Gómez, 1998).

2.3.3.2. Establecimiento y mantenimiento de células en suspensión

En la mayoría de los cultivos se emplean, como material de partida para el establecimiento de suspensiones celulares, callos con embriogénesis somática de alta frecuencia y/o embriones somáticos obtenidos, en etapas iniciales de desarrollo (Gómez, 1998). Más reciente, Chong *et al.* (2005) lograron el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas empleando agregados florales del cultivar de banano 'Gran enano' directamente en el medio de cultivo líquido en agitación.

Según Schoofs *et al.* (1999) en los plátanos y bananos generalmente las suspensiones jóvenes requieren una muy alta densidad de inóculo inicial y renovación frecuente del medio de mantenimiento (cada tres a siete días) durante los primeros meses, pudiendo existir diferencia en la respuesta de distintas líneas celulares del mismo clon lo que puede ser una característica intrínseca del material.

La diferenciación de las células individuales que se desprenden de los agregados de las células embriogénicas y callos nodulares, se realiza rápidamente, seguida por su degeneración y oxidación, estas células deben ser renovadas lo más rápido posible en cada subcultivo, ya que las mismas tienden a inducir una diferenciación general de células y tejidos, así mismo se deben renovar los agregados muy grandes y los embriones somáticos más desarrollados, ya que ellos tienden a acumular el almidón en sus células exteriores. Estos embriones abortados, luego empiezan a producir altas cantidades de fenoles (Shoofs *et al.*, 1999).

Georget *et al.* (2000), señalaron que la calidad de una suspensión celular embriogénica disminuye con el número de subcultivos. Esto produce como

resultado una creciente probabilidad de contaminación y una disminuida tasa de crecimiento y capacidad de regeneración, debido, por ejemplo, a la invasión de las células densas de rápido crecimiento, ricas en almidón.

También se han realizado estudios sobre el suministro de carbono para el buen desarrollo de las suspensiones por lo cual se plantea que es suficiente 30 g.L⁻¹ de sacarosa (Lerma *et al.*, (2002).

Strosse *et al.* (2003) señalan que una suspensión celular embriogénica de buena calidad tiene las siguientes características: presencia de una alta proporción de agregados de células embriogénicas proliferantes, color que generalmente varía de amarillo brillante a pálido, una rápida precipitación de células cuando la suspensión es removida del vibrador orbital, indicando una alta densidad del contenido celular, tasa de multiplicación entre 1,5 y 2,0 por un período de subcultivo de dos semanas y una alta capacidad de regeneración.

2.3.3.3. Formación de los embriones somáticos

Para inducir la formación de los embriones somáticos, es necesario reducir en el medio de cultivo las concentraciones de auxinas, o usar tipos menos fuertes, e incluso, sin la presencia de estas fitohormonas; especialmente cuando se trabaja con plantas monocotiledóneas. En algunas especies resulta necesario adicionar una citoquinina (Nomura y Komamine, 1995; Arnold *et al.*, 2002).

Daniels (2003) señaló que la capacidad de formación de embriones somáticos, también está relacionada con la edad de la suspensión celular, las que se mantuvieron hasta los 14 meses tuvieron la máxima capacidad de formar embriones somáticos. A partir de los 16 meses de cultivo, la capacidad de estas disminuyó con diferencia significativa en relación a las suspensiones celulares

más jóvenes. A los 18 y 20 meses de edad, solo se formaron $584,70 \pm 5,87$ embriones somáticos. Estos elementos (reguladores de crecimiento) favorecen el proceso de la histodiferenciación de las células. Varios autores han hecho referencia al papel de la densidad de inóculo inicial y su relación con el proceso de diferenciación de los embriones somáticos en el cultivo de la zanahoria (Osuga y Komamine, 1993; Osuga y Komamine, 1994; Shigeta *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos por 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 estimula o reprime la formación de los embriones; elevadas densidades hacen que las suspensiones sólo se multipliquen, influyendo en la respuesta asincrónica de los embriones somáticos. Con relación a esto se conoce que sólo los embriones que se encuentran en etapas más avanzadas del proceso de histodiferenciación, son capaces de germinar y dar lugar a plantas completas.

Otro aspecto a tener en cuenta para facilitar la formación y la sincronización de los embriones somáticos consiste en tamizar los agregados celulares y lavar éstos antes de su inoculación, para eliminar residuos del medio de cultivo anterior (Arnold *et al.*, 2002).

Wong *et al.* (2006) estudiaron diferentes concentraciones de 6-BAP en la formación y diferenciación de embriones somáticos de bananos en medios de cultivo líquido y semisólido, obteniendo los mayores resultados a medida que aumentaron la concentración de esta citoquinina.

Uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes, es la habilidad de

los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente (Merkle *et al.*, 1995). Estos procesos de multiplicación han recibido varios términos, como embriogénesis secundaria, recurrente o repetitiva (Gómez, 1998).

2.3.3.4. Maduración de los embriones somáticos

La fase de maduración es el período en el desarrollo de los embriones somáticos en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y adquieren tolerancia a la desecación (Parrott, 1993).

En esta etapa juegan un papel fundamental la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, siendo necesaria la adición al mismo de nitratos, amonios, aminoácidos y caseína hidrolizada. Los carbohidratos entre ellos la sacarosa en concentraciones de 3,0 – 6,0%, son esenciales, junto a bajas concentraciones de oxígeno en el medio, lo cual permite una total maduración y evita la germinación precoz.

La adición de ácido abscísico (ABA) durante la etapa de maduración del embrión, promueve la acumulación de sustancias de reserva, que seguido de un apropiado tiempo de secado, puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos y también previene la germinación precoz (Attree *et al.*, 1991; Kärkönen, 2000).

La correcta acumulación de reservas conlleva a un incremento en el peso seco de los embriones somáticos, lo que indica una alta calidad en su vigor e influye positivamente en su posterior germinación (Fuji *et al.*, 1990). Como marcadores de la calidad del desarrollo del embrión somático se han utilizado distintas sustancias

de reserva, tales como la acumulación de proteínas, lípidos y almidón (Merkle *et al.*, 1995).

La necesidad de esta fase de maduración de los embriones somáticos fue corroborada por Cabrera *et al.* (2002) en el cultivar de plátano vianda 'Navolean' (Grupo AAB) cuando utilizaron las multiyemas como explante inicial. En este mismo cultivar se comprobó que cuando los embriones somáticos no fueron cultivados previamente en el medio de maduración, solo germinó el 18,60% de los mismos (López 2006).

El uso de las citoquininas en el medio de cultivo juega un papel importante en la maduración de los embriones somáticos, lo cual ha sido demostrado por varios autores (Akula *et al.*, 2000; Onay *et al.*, 2000; Sarasan *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). En especial el 6-BAP ha sido muy empleado en varias especies de plantas. Schuller *et al.* (2000), incrementaron el número de embriones y su maduración con el uso de esta citoquinina.

2.3.3.5. Germinación y conversión en plantas

La germinación hace referencia al desarrollo de raíces y brotes, mientras la conversión es la supervivencia de estos propágulos en condiciones *ex vitro* (Stuart y Strickland, 1984). Varios autores, al pasar los embriones directamente de las condiciones de maduración a germinación, han alcanzado pobres resultados (Parrott *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1990; Senaratna *et al.*, 1990). Esto sugiere el empleo de tratamientos postmaduración, para mejorar la germinación de los embriones.

Muy a menudo se hace referencia por los autores a la habilidad de los embriones somáticos para la germinación, pero se ofrecen muy pocos datos sobre su

conversión. La obtención de plantas *in vitro* con raíces, no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Anandarajah y McKersie 1990; Fuji *et al.*, 1990; Senaratna *et al.*, 1990).

2.4. Embriogénesis somática en *Musa* spp.

En *Musa* la obtención de un sistema de regeneración eficiente por medio de la embriogénesis somática responde a dos objetivos: tener una técnica competitiva para la multiplicación masiva y un sistema celular indispensable para el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética (Grapin *et al.*, 1998).

El primer informe sobre la embriogénesis en *Musa* corresponde a Cronauer y Krikorian (1983), quienes lograron embriones a partir de suspensiones celulares derivadas de ápices cultivados *in vitro* de los triploides 'Saba' y 'Pelipita' (ABB). Cronauer y Krikorian (1988), obtuvieron embriones somáticos de *Musa ornata*; cultivando embriones cigóticos inmaduros de este diploide ornamental. Sin embargo, esta técnica es limitada para especies seminíferas y no se puede aplicar para un gran número de genotipos.

Novak *et al.* (1989), obtuvieron suspensiones embriogénicas con callos formados a partir de rizoma en cultivares diploides y triploides. Dhed'a *et al.* (1991) desarrolló una metodología para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de *scalps*, estos fueron explantes derivados de brotes adventicios (multiyemas); después de un mes en el medio de inducción, las estructuras nodulares llamados glóbulos meristemáticos, aparecieron sobre la superficie del *scalps*. El cultivo continuo de estos glóbulos meristemáticos en medio líquido dio lugar a la formación de suspensiones celulares embriogénicas.

Dicha metodología fue empleada y mejorada en otros cultivares por Schoofs (1997).

Escalant *et al.* (1994), utilizando Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), logró aumentar el porcentaje de embriones somáticos germinados; mientras que Grapin *et al.* (1996) y Côte *et al.* (1996), obtuvieron suspensiones celulares con adecuadas tasas de regeneración, utilizando como explante inicial flores masculinas, pero esta técnica no se ha extendido para todos los tipos de *Musa* (*horn* y *pseudo horn*). También se han formado callos con células embriogénicas a partir de explantes de flores femeninas inmaduras, las cuales son extraídas de las plantas en la etapa de transición de la fase vegetativa a la floral, eliminando las hojas y abriendo el pseudotallo para extraer la inflorescencia joven (Grapin *et al.*, 2000). Con este último método la planta no llega a desarrollar el racimo, lo cual limita su aplicación a gran escala.

En la actualidad, la embriogénesis somática es aplicada a gran escala en cultivares comerciales de *Musa* spp. a partir de dos metodologías: el uso de multiyemas, denominados *scalps* (Dhed'a *et al.*, 1991) mejorada por Schoofs (1997) y de flores masculinas inmaduras (Escalant *et al.*, 1994).

Este último método no es aplicable a los cultivares de plátanos AAB, pertenecientes a los tipos *Horn*, *Pseudo horn* e intermedio, por carecer de inflorescencia masculina persistente, lo cual limita la inducción del proceso embriogénico a un solo tipo de explante (multiyemas). Para el éxito del mismo, se necesita realizar múltiples subcultivos que requieren de 5 a 14 meses, en un medio de cultivo suplementado con altas concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) (22,5 mg.L⁻¹) según el genotipo a utilizar (Schoofs *et al.*, 1999). Al

respecto, Reuveni *et al.* (1993) señalaron que el uso de altas concentraciones de citoquinina hace que predominen las yemas adventicias, lo que provocó en *Musa* spp., un incremento de la variabilidad genética de 4 a 10 veces con respecto a la regeneración por yemas axilares, según dichos autores.

En el contexto nacional, se han obtenido resultados muy alentadores en los bananos al utilizar la metodología propuesta por Escalant *et al.* (1994) y mejorada por Gómez *et al.* (2000). En los cultivares del grupo AAB, que no poseen inflorescencia masculina persistente, se utiliza la metodología propuesta por López (2006) que utiliza como explantes ápices meristemáticos de brotes de yemas axilares obtenidos en presencia de ancimídol.

Ambas metodologías, Gómez *et al.* (2000) y López (2006), fueron escaladas a nivel de Biofábricas a través de la germinación de los embriones somáticos, las cuales propiciaron una buena estabilidad genética de las plantas regeneradas (López *et al.* (2011) y Gómez *et al.* (2012)).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. El mismo se llevó a cabo durante el período comprendido entre enero de 2012 y febrero de 2013.

Procedimientos generales

Los medios de cultivo fueron esterilizados en la autoclave a 121°C y 1,2 kg.cm⁻² de presión, por tiempos que variaron en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar, según información técnica de la firma *SIGMA* (1991). La zeatina se esterilizó por filtración a través de filtros (0,22 µm) de acetato de celulosa *SARTORIUS*.

La cristalería y otros accesorios empleados en la siembra y manipulación de las suspensiones celulares, fueron esterilizadas en estufa a 180°C durante dos horas. El instrumental (pinzas, espátulas y bisturís), se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo *DENT-EQ* que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar, donde se realizó el manejo de los materiales biológicos (establecimiento, subcultivos y cambios de medios de cultivo).

Según el experimento, se emplearon tubos de ensayos (50 x 25 mm) con 10 mL de medio de cultivo, placas Petri (80 x 15 mm) con 15 mL de medio de cultivo y Erlenmeyer de 100 mL con medio de cultivo variable según se detalla en cada experimento realizado. El pH fue ajustado con NaOH 0,5 N y HCl 0,5 N, antes de la esterilización en autoclave.

Para determinar las densidades celulares necesarias en los diferentes experimentos, se utilizó el método del volumen de células sedimentadas (VCS) (Schoofs, 1997). Se tomaron tubos cónicos graduados (15 mL), en los que se

colocó la suspensión de células y medio de cultivo necesarios para obtener la concentración deseada. Posteriormente, con auxilio de una pipeta Pasteur, fueron llevadas a una concentración final del 25,0% del VCS en el tubo y a partir de ésta se obtuvo la densidad celular deseada según el experimento. Las pipetas empleadas durante todo el trabajo fueron utilizadas con la ayuda de un dispensador manual para pipetas modelo *PIPET-AID*.

La masa fresca se expresó en gramos de masa fresca (gMF) y esta operación se realizó con el auxilio de una balanza analítica modelo *SARTORIUS*, dentro de la cámara de flujo laminar.

Los frascos de cultivo utilizados en los diferentes experimentos realizados se colocaron en una cámara de cultivo a una temperatura de $27 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e iluminación artificial mediante tubos fluorescentes, con régimen de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $62\text{-}68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Para el procesamiento de los datos se emplearon los paquetes estadísticos *SPSS* ver. 15,0 y *CURVE EXPERT* ver. 1.3 para *Windows*. En cada experimento se detallan las pruebas realizadas.

Material vegetal

Se utilizó el cultivar 'FHIA – 25' procedente del Banco de Germoplasma del INIVIT, por su interés en el Programa de Mejoramiento Genético del Plátano en Cuba (González, 2005).

Establecimiento *in vitro* de los ápices

El establecimiento *in vitro* de los ápices se realizó a partir de plantas en floración, previamente seleccionadas con buen estado fitosanitario. Se seleccionaron hijuelos tipo "espada", con una altura entre 25 y 30 cm, los cuales fueron llevados

a condiciones semicontroladas, en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán). El riego se realizó por microaspersión mediante el sistema microjet, lo cual garantizó una humedad relativa entre el 85 y 90%.

Transcurridos 45 días, se eliminaron las partes más externas del cormo y las vainas foliares, hasta obtener secciones con el ápice caulinar de aproximadamente 5,0 cm de largo y 2,5 cm de diámetro.

Se realizó una primera desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3,0% (v/v) durante 20 minutos, seguido por tres lavados con agua desionizada estéril durante cinco minutos cada uno. En cabina de flujo laminar se redujo el tamaño de estas secciones hasta unos 2 – 3 cm de altura con una base cuadrada de 1,5 cm aproximadamente, seguido de una segunda desinfección durante 10 minutos con NaOCl al 2,5% (v/v) y tres lavados con agua destilada estéril. Después se redujo su tamaño hasta obtener un ápice de aproximadamente 0,5 cm². El establecimiento de los mismos se realizó en el medio de cultivo basal constituido por las sales y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementadas con sacarosa (30 g.L⁻¹), mioinositol (100 mg.L⁻¹), ácido ascórbico (10 mg.L⁻¹), ácido indolacético (AIA) (0,88 mg.L⁻¹), 6-BAP (1,13 mg.L⁻¹), y pH 5,8 en estado líquido durante 18 días, según López (1999). Las condiciones de cultivo fueron las anteriormente descritas en procedimientos generales para el régimen de 16 horas de luz.

Una vez establecidos los ápices meristemáticos, se realizaron cuatro subcultivos con intervalos de 21 días para disponer de la cantidad de material vegetal necesario para realizar el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas. Se utilizó el medio de cultivo P5-0,2, constituido por las sales y

vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementadas con sacarosa (30 g.L⁻¹), mioinositol (100 mg.L⁻¹), ácido ascórbico (10 mg.L⁻¹), ácido indolacético (AIA) (0,17 mg.L⁻¹), 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (2,25 mg.L⁻¹) y ancimidol (0,2 mg.L⁻¹), el mismo fue gelificado con 2,3 g.L⁻¹ de Gelrite® (SIGMA) y ajustado a pH de 5,8 según López (2006). Las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas para el establecimiento *in vitro* de los ápices.

3.1. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes de yemas axilares

El objetivo de este experimento fue el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes de yemas axilares, los cuales fueron colocados en cinco Erlenmeyer de 100 mL (con ocho explantes cada uno) que contenían el medio de cultivo líquido ZZ (Schoofs, 1997), el cual estuvo constituido por las sales MS (1962) reducidas al 50% de su concentración y las vitaminas del mismo medio de cultivo citado, se suplementó con ácido ascórbico (10 mg.L⁻¹), mioinositol (100 mg.L⁻¹), 2,4-D (1,0 mg.L⁻¹), zeatina (0,22 mg.L⁻¹) y sacarosa (30 g.L⁻¹) a pH 5,8.

Los Erlenmeyers se colocaron en un agitador orbital modelo Laboshake, a la velocidad de 90 r.p.m. y bajo el régimen de 16 horas de luz descrito en los procedimientos generales.

Durante los dos primeros meses los cambios de medios de cultivo se realizaron cada siete días de cultivo y consistieron en la renovación del 100% del medio de cultivo, al tercer mes de cultivo estos cambios se realizaron cada tres días renovando el 50% del medio de cultivo. Luego al cuarto mes de cultivo fueron

tomados los glóbulos meristemáticos formados y se subcultivaron cada siete días de cultivo renovando el 90% del medio de cultivo viejo.

Transcurridos 135 días en esta fase, se evaluó el número de agregados embriogénicos formados por mL de cultivo. Los conteos se efectuaron en cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad. Para esto se tomaron cinco muestras por cada Erlenmeyer y se extrajo de cada una 1,0 mL de suspensión celular, después de ser homogenizada por agitación. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de Dunett C. Se consideró significativo si $p < 0,05$.

Una vez establecidos los cultivos celulares, fueron tamizados a través de filtros de malla metálica, con un diámetro de poro de 500 μm . Estos filtrados constituyeron las suspensiones celulares utilizadas en los diferentes estudios realizados.

3.2. Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas

Una vez establecidas las suspensiones celulares, con el objetivo de evaluar la influencia de la densidad celular con relación a la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares y determinar el valor mínimo de inóculo que permitiera una correcta multiplicación de las mismas, se estudiaron tres densidades de inóculo. A partir del seguimiento de estas tres densidades de inóculo inicial de VCS (3,0; 6,0 y 9,0%), se midió cada tres días el incremento o multiplicación celular de cada tratamiento, según la metodología de evaluación propuesta por Schoofs (1997). El estudio se inició con la densidad de inóculo de 3,0% de VCS, basado en resultados previos obtenidos para el cultivar 'Navolean' por López (2006). Para ello se emplearon cinco Erlenmeyers de 25 ml de capacidad por cada densidad estudiada. El medio y las condiciones de cultivo fueron similares a los descritos

para el establecimiento de las suspensiones celulares en el epígrafe 3.1., pero sin renovar el medio de cultivo durante los 24 días que duró el experimento.

Para el análisis del crecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas se utilizó el modelo de regresión no lineal de Gauss mediante el programa de ajuste de curvas, *CURVE EXPERT* 1,3.

3.3. Formación de los embriones somáticos

Con el objetivo de lograr la formación de los embriones somáticos a partir de las suspensiones celulares embriogénicas obtenidas y multiplicadas a la densidad celular del 3,0% de VCS, se utilizó la metodología recomendada por López (2006). Las suspensiones celulares embriogénicas fueron ajustadas al 12% de volumen de células sedimentadas y cultivadas en el medio de cultivo RD1 (Dhed'a *et al.*, 1991). El mismo estuvo constituido por el 50% de las sales MS y vitaminas, suplementado con sacarosa (30 g.L⁻¹), mioinositol (100 mg.L⁻¹), ácido ascórbico (10 mg.L⁻¹), sin reguladores del crecimiento y pH 5,8 de consistencia semisólido (Phytigel (*SIGMA*) 2,3 g.L⁻¹).

Se emplearon cinco placas Petri por cada suspensión celular estudiada. A cada placa Petri se le colocaron sobre el medio de cultivo cuatro mallas de poliestireno con un tamaño de 1,0 cm² y poros de 100 μm. Luego se añadieron 200 μL de células mediante una micropipeta *GILSON*, con la punta cortada al 12% de VCS. Las condiciones de cultivo utilizadas fueron las descritas en los procedimientos generales para régimen de 16 horas luz.

El número de embriones somáticos formados se evaluó a los 45 días de cultivo, para esto se tomó y pesó 0,1 gMF de embriones somáticos formados, los cuales se adicionaron a un *beaker*, que contenía una mezcla de 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel

(*SIGMA*) y agua. Posteriormente se vertió la mezcla en una placa Petri, se dejó gelificar y se dividió en cuadrantes para facilitar su conteo, el cual se realizó bajo un microscopio estereoscópico modelo *Stemi SV 11*.

Para la comparación de los tratamientos, se aplicó el análisis de varianza de Tukey, con un nivel de significación de $p < 0,05$.

3.4. Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación

Con el objetivo de lograr la maduración de los embriones somáticos formados, se realizó un experimento en el cual se evaluó el efecto de tres tiempos de cultivo (15; 30 y 45 días).

Los embriones somáticos fueron tomados a los 45 días de permanecer en el medio de cultivo RD1 (Dhed'a *et al.*, 1991) en estado semisólido, proveniente de las suspensiones celulares 1 y 2 (epígrafe 3.3.) y se colocaron a la densidad de inóculo inicial de 0,5 gMF de embriones somáticos en cinco placas Petri por cada variante de tiempo de cultivo estudiado, en el medio de cultivo para la maduración de los embriones somáticos propuesto por López (2006), constituido por las sales y vitaminas del medio de cultivo MS (1962), suplementado con ácido ascórbico (10 mg.L⁻¹), sacarosa (45 g.L⁻¹), mioinositol (100 mg.L⁻¹), zeatina (0,22 mg.L⁻¹), AIA (2,0 mg.L⁻¹), gelificado con Phytigel (*SIGMA*) (2,3 g.L⁻¹) y pH 5,8.

Para determinar el estado de maduración de los embriones somáticos, fue evaluada su germinación a partir de una muestra de 50 embriones somáticos a los 15, 30 y 45 días de cultivo de cada uno de los tratamientos estudiados. Para ello, se colocaron los embriones somáticos de cada repetición de los tratamientos durante 30 días en diferentes placas Petri, que contenían el medio de cultivo para

la germinación de embriones somáticos propuesto por Gómez *et al.*, (2000). El mismo estuvo constituido por las sales MS (1962), vitaminas de Morel (1950) y suplementado con sacarosa (30 g.L⁻¹), AIA (2,0 mg.L⁻¹), 6-BAP (0,5 mg.L⁻¹), biotina (0,01 mg.L⁻¹) y biobrás-6 (0,01 mg.L⁻¹). El gelificante utilizado fue Phytigel (*SIGMA*) (2,3 g.L⁻¹) y se ajustó el pH del medio de cultivo a 5,8.

Como control del experimento se utilizaron 50 embriones somáticos tomados del medio de cultivo RD1 (descrito anteriormente), a los 45 días de cultivo y sin pasar por el medio de cultivo de maduración. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en los procedimientos generales para régimen de 16 horas luz.

Para la comparación de los tratamientos, se aplicó el análisis de varianza de Tukey, con un nivel de significación de $p < 0,01$.

3.5. Conversión a plantas de los embriones somáticos

Con el objetivo de lograr la conversión de los embriones somáticos en plantas, se evaluó la supervivencia y desarrollo en condiciones ambientales *ex vitro* de los embriones somáticos producidos, en comparación con plántulas provenientes de la propagación por organogénesis (ápices meristemáticos) utilizados como control en la propagación *in vitro*.

Esta fase se desarrolló según la metodología propuesta por Pérez *et al.* (1999), en condiciones semicontroladas, en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán), que permitía el paso de una densidad de FFF de 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El riego se realizó por microaspersión, mediante sistema Microjet con una frecuencia de seis riegos al día y una duración de dos minutos cada uno. Se garantizó una humedad relativa del 85-90%.

Se utilizaron bandejas de polieturano de 70 orificios, con un volumen de 100 cm³ de cachaza. Se transfirieron 350 plantas por cada procedencia, con una altura de 4-5 cm y de dos a tres hojas, que fueron plantadas a una profundidad de 1,0 cm. Luego, a los cinco días de plantadas se evaluó el porcentaje de supervivencia y transcurridos 60 días, antes de transferirlas a campo, se evaluaron las principales variables fenotípicas, tales como: altura de la planta (cm), largo del pecíolo de la hoja dos (cm), largo de la hoja dos (cm), ancho de la hoja dos (cm), distancia entre las hojas dos y tres (cm) en 60 plantas de cada procedencia, así como las variaciones fenotípicas observadas en toda la población según la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una prueba de hipótesis para muestras independientes (T-Student), los niveles de significación establecidos fueron: significativo para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes de yemas axilares

Se logró el establecimiento de tres Erlenmeyers de suspensiones celulares embriogénicas de los cinco iniciados a partir de los ápices de brotes de yemas axilares sin pasar por una fase de callo. Al evaluar el número de agregados embriogénicos en las suspensiones celulares establecidas (Tabla 1), no se encontraron diferencias estadísticas significativas.

Tabla 1. Cantidad de agregados embriogénicos presentes a los 135 días de establecidas las suspensiones celulares embriogénicas del cv. 'FHIA – 25'.

Suspensiones	Número de agregados embriogénicos.mL ⁻¹
Suspensión 1	26,9 x 10 ⁴
Suspensión 2	27,6 x 10 ⁴
Suspensión 3	27,2 x 10 ⁴

Prueba de Dunett C. ns: No significativo ES± 0,22

Durante el primer mes se observó fenolización en la zona de corte de los explantes y posteriormente el engrosamiento de los mismos.

Transcurridos dos meses de cultivo fueron observadas estructuras globulares amarillas en la superficie de los explantes, las cuales se separaron de estos y

comenzaron a liberar los agregados embriogénicos, además de la presencia de células alargadas y vacuoladas.

Con la observación periódica, bajo microscopio óptico, de las suspensiones celulares se verificaron cambios en su composición, fue posible apreciar células embriogénicas pequeñas y esféricas, con un contenido citoplasmático denso, gránulos de almidón y una alta razón núcleo/citoplasma. A medida que se realizaron los subcultivos posteriores, la cantidad de células aisladas y parenquimatosas disminuyeron a valores casi nulos. Estos agregados embriogénicos llegaron a ocupar entre 90 y 94% de la suspensión celular y su tamaño varió entre 80 y 300 μm transcurridos 135 días de cultivo (Fig. 1).

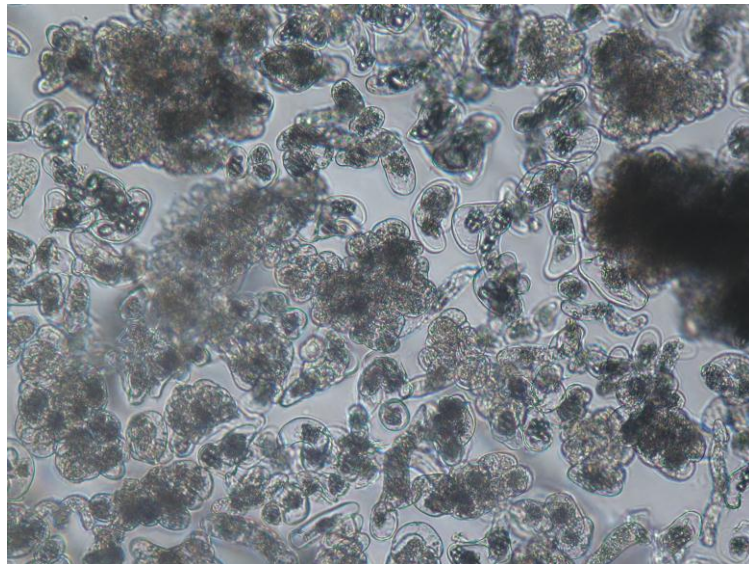


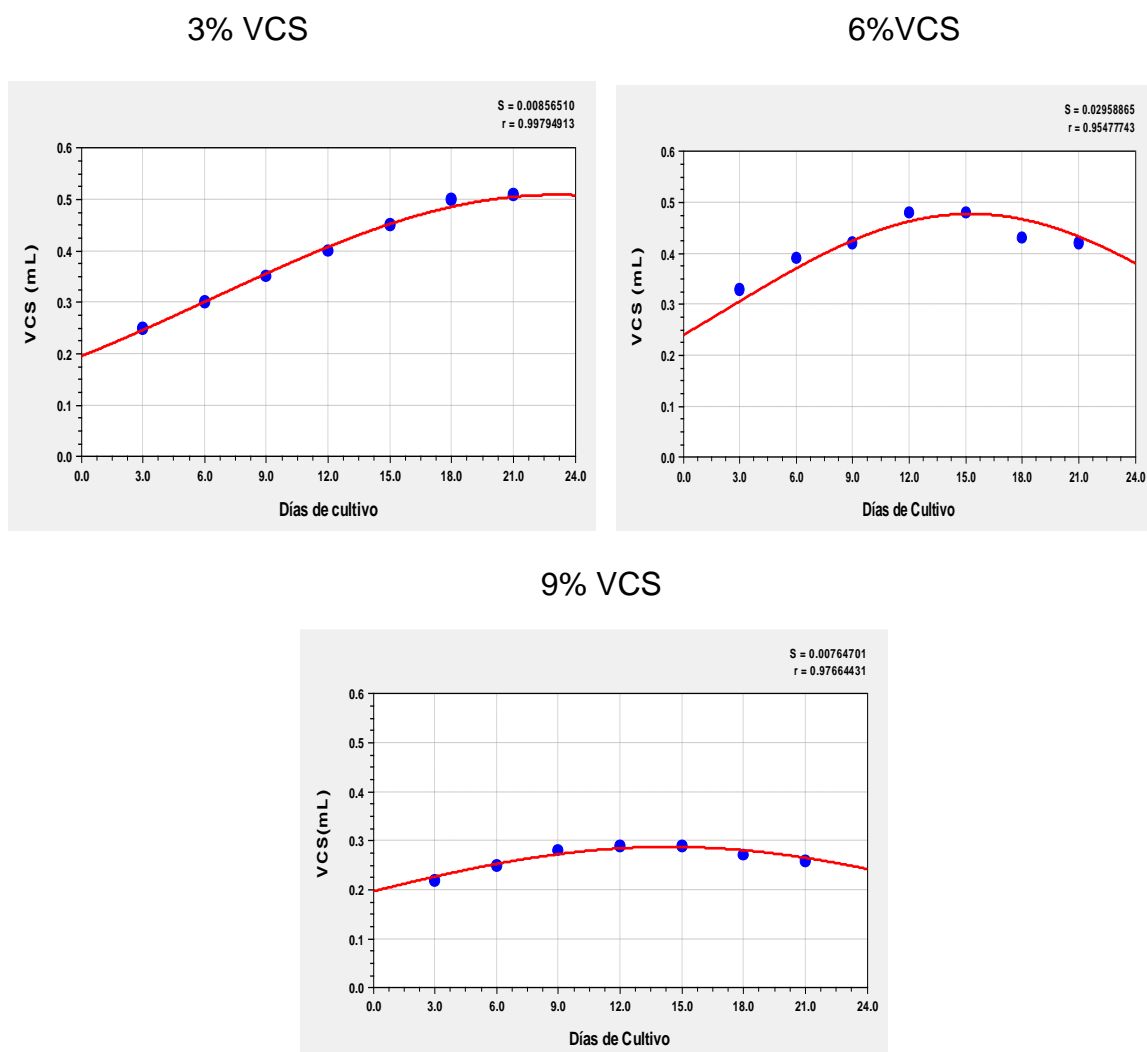
Figura 1. Agregados celulares embriogénicos de suspensiones celulares obtenidas a partir de los ápices de brotes de yemas axilares en medio de cultivo líquido del cv. 'FHIA – 25' (60x).

Los resultados alcanzados en este experimento permitieron el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de los ápices de brotes de yemas axilares colocados directamente en el medio de cultivo líquido sin pasar por la fase de callo.

4.2. Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas

Las curvas de crecimiento celular establecidas de las suspensiones celulares, se caracterizaron al inicio por una fase de reposo o latencia, debido a que en 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 (Shigeta *et al.*, 1996).

La densidad celular de 3,0% de VCS favoreció el incremento celular con relación a las curvas de crecimiento del 6,0 y 9,0% de VCS (Fig. 2). En los datos obtenidos mediante el modelo de Gauss se observó que el mayor incremento de biomasa celular se produjo a los 23,1 días de cultivo (0,51 mL) al 3,0% de VCS.



Modelo de Gauss $y=ae^{-(x-b)^2/2c^2}$

VCS	a	b	c	R ²
3,0%	0,509	23,107	16,695	0,997
6,0%	0,477	15, 239	12,991	0,954
9,0%	0,2978	14,2368	17,4112	0,8316

Leyenda:

- a. Máximo crecimiento de VCS
- b. Número de días en que se alcanza el valor máximo de VCS
- c. Varianza del modelo Gauss

Figura 2. Influencia de la densidad celular en la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares establecidas en el cv. 'FHIA – 25'.

Esta misma densidad celular mostró una fase de crecimiento exponencial, bien definida y continua, sin deterioro de la calidad celular (predominio de células meristemáticas y vitalidad celular de 90 – 95%).

Lo anterior demuestra que durante esta fase las células son biológicamente activas y alcanzan su máxima tasa de división, lo cual indica que los subcultivos de las suspensiones celulares deben realizarse a la densidad celular del 3,0% de VCS y a los 15 días de cultivo, para que las mismas se mantengan en multiplicación continua sin pasar a la fase lineal.

En la densidad celular de 6,0% de VCS, según los datos obtenidos mediante el modelo de Gauss se observó que el mayor incremento de biomasa celular se produjo a los 15,2 días de cultivo (0,48 mL de VCS). A partir de esta fecha no se produjo incremento del volumen de células y comenzó a disminuir su calidad y vitalidad.

Cuando se multiplicaron las células al 9,0% de VCS, no se llegó a duplicar su volumen inicial y la calidad de la suspensión celular y su vitalidad disminuyeron bruscamente, lo que refiere que esto pudo ser provocado por el empleo del volumen de células no adecuado. Se comenzaron a observar células alargadas y con escasos gránulos de almidón, lo cual pudo estar dado por la disminución de nutrientes y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente el 2,4-D.

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.

Basado en los resultados alcanzados en este experimento, se pudo concluir que las suspensiones celulares iniciadas al 3,0% del VCS de inoculación, tuvieron una mejor respuesta bajo las condiciones de manejo y cultivo previamente explicadas.

4.3. Formación de los embriones somáticos

Transcurridos 45 días de haber sido plaqueadas las suspensiones celulares embriogénicas en el medio de cultivo RD1 se realizó el conteo de los embriones formados. Las suspensiones celulares 1 y 2 formaron un total de 1580 y 1610 embriones somáticos respectivamente por cada 200 μ L al 12% de VCS plaqueado, sin diferencias estadísticas entre ellas y sí con la suspensión celular 3 que solo formó 803 embriones somáticos (Tabla 2).

Tabla 2. Número de embriones somáticos formados a los 45 días de cultivo en el medio de cultivo RD1 semisólido del cv. 'FHIA – 25'.

Suspensiones	Embriones somáticos formados
Suspensión 1	1580 a
Suspensión 2	1610 a
Suspensión 3	803 b
	ES \pm 0,22

Embriones somáticos formados con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Tukey.

Por los resultados alcanzados durante la etapa de formación de los embriones somáticos, se establece como condición de cultivo para el cv. 'FHIA – 25', iniciar el

proceso de histodiferenciación a partir de suspensiones celulares embriogénicas a la densidad celular de 12,0% de VCS, lo cual propició el establecimiento del proceso de formación de los embriones somáticos.

4.4. Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación

Al evaluar el tiempo de incubación en el medio de cultivo de maduración, se observó que cuando los embriones somáticos se incubaron durante 30 días de cultivo se favoreció su maduración, lo cual propició un 48,30% de embriones germinados, con diferencias significativas del resto de los tratamientos estudiados (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia del tiempo de cultivo (días), en el medio de cultivo de maduración, sobre la germinación (%) de los embriones somáticos en el cv. 'FHIA 25'.

Tiempo de cultivo	Embriones germinados (%)
15	30,50 c
30	48,30 a
45	36,80 b
Control (0)	15,00 d
ES± 0,22	

Porcentajes con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0,01$ según la prueba de Tukey.

Los embriones somáticos maduros (Fig. 3) mostraron una invaginación de forma circular con el centro opaco y la presencia de una zona meristemática densa,

correspondiente a un estado codiforme, con su desarrollo posterior el embrión evolucionó asimétricamente hasta convertirse en un embrión cotiledonar, característico de especies monocotiledóneas según fue señalado por Natesh y Rau (1984).



Figura 3. Embriones somáticos maduros con invaginación circular (100x) a los 30 días de incubación en el medio de cultivo de maduración de los embriones somáticos.

Se comprobó además en esta investigación, que cuando los embriones somáticos no fueron cultivados previamente en el medio de cultivo de maduración, sólo germinó el 15,00% de los mismos.

A partir de estos resultados se definió para la fase de maduración de los embriones somáticos, la densidad de inóculo inicial de 0,5 gMF de embriones somáticos durante 30 días de incubación en el medio de cultivo de maduración.

4.5. Conversión a plantas de los embriones somáticos

Al evaluar las características de las plantas provenientes de los embriones somáticos, en comparación con las plantas regeneradas por organogénesis, se observó que en ambos casos se obtuvo un alto porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatización, en el caso de las plantas procedentes de embriones somáticos fue de 98,0% y en el control de organogénesis de 97,4%.

Transcurridos 60 días en esta fase y previo a su trasplante a campo, no se observaron cambios fenotípicos en ambos sistemas de regeneración. Con relación a las variables medidas excepto en la altura de la planta, hubo diferencias estadísticas significativas en las demás variables evaluadas a favor de las plantas regeneradas por embriogénesis somática (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación entre las plantas obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis a los 60 días en la fase de aclimatización del cv. 'FHIA – 25'.

Medio de cultivo	Largo del pecíolo (cm)	Ancho de la hoja 2 (cm)	Largo de la hoja 2 (cm)	Distancia entre las hojas 2 y 3 (cm)	Altura de la planta (cm)
Embriogénesis	4,95	9,60	26,00	1,80	40,00
Organogénesis	4,40	9,30	25,20	1,75	39,00
T-Student	0,021*	0,013*	0,022*	0,024*	0,7ns

Nivel de significación para $p < 0,05$

5. DISCUSIÓN

5.1. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes de yemas axilares

El establecimiento de tres Erlenmeyers de suspensiones celulares embriogénicas de los cinco iniciados a partir del explante de ápices de brotes de yemas axilares se corresponde con lo publicado por Schoofs *et al.* (1999), cuando señalaron que no todo complejo embriogénico dará una buena suspensión celular. Estos autores utilizaron las multiyemas como fuente de explante para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas y obtuvieron que la tasa exitosa fue de uno de dos o uno de cinco, o sea que la investigación desarrollada está en correspondencia con los resultados alcanzados por otros autores.

La formación de estructuras globulares amarillas y su posterior desarrollo también había sido señalada con anterioridad por otros autores como Dhed'a *et al.* (1991), quienes establecieron suspensiones celulares embriogénicas a partir de scalps derivados de brotes adventicios (multiyemas), en el cultivar 'Bluggoe' (ABB).

Otros indicadores de la buena calidad de la suspensión celular embriogénica establecida fueron la presencia de una alta proporción de agregados de células embriogénicas proliferantes, el cambio de color de amarillo brillante a pálido y la rápida precipitación de células cuando la suspensión es removida del vibrador orbital, lo cual indicó una alta densidad del contenido celular, señalado también por Strosse *et al.* (2003) como parámetros indicativos para identificar una suspensión celular embriogénica de buena calidad.

Resultados similares durante la etapa de establecimiento de las suspensiones celulares fueron obtenidos por Chong *et al.* (2005) al utilizar las inflorescencias

masculinas del cultivar 'Grande naine' (AAA) para establecer suspensiones celulares embriogénicas, directamente en medio líquido, sin pasar por una fase de callo.

Por otra parte, en los últimos años continúa siendo un uso rutinario por varios autores (Khaliln y Elbanna, 2004; Michielse *et al.*, 2005) la formación de un callo con estructuras embriogénicas como fuente de explante para lograr el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas. Aunque quedó demostrado por Chong *et al.* (2005) que el establecimiento de las suspensiones celulares directamente de los explantes de inflorescencias masculinas inmaduras permitió obtener suspensiones celulares embriogénicas homogéneas en 20 semanas (aproximadamente 5 meses) y una respuesta superior al 70% de los explantes inoculados. Sin embargo, la metodología propuesta por Côte *et al.* (1996) y Grapin *et al.* (1996) consumió entre cuatro y siete meses solamente para la formación de callos con estructuras embriogénicas y dos meses más para el establecimiento de las suspensiones celulares.

Los resultados alcanzados en este experimento demostraron que es posible el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en medio de cultivo líquido directamente sin pasar por una fase de callo, en el cultivar 'FHIA – 25' a los 135 días.

5.2. Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas

Schoofs *et al.* (1999) establecieron en la etapa de multiplicación celular curvas de crecimiento logarítmico en suspensiones celulares embriogénicas, derivadas del explante de multiyemas en el cv. 'Williams' (AAA). Estos autores obtuvieron que

los VCS de 3,0 y 5,0% fueron superiores al VCS del 10% y a su vez las suspensiones celulares revelaron la casi ausencia de la fase logarítmica bajo estas condiciones.

También Barranco (2001) a partir de suspensiones establecidas de embriones somáticos obtenidos del cultivo de flores masculinas en el cv. 'FHIA – 18' (AAAB), alcanzó la mejor multiplicación a la densidad celular de 3,0% de VCS con una curva de crecimiento exponencial.

Trang y Thanh, (2004) observaron durante el crecimiento de las suspensiones de células del cv. 'Cau man', una curva de crecimiento sigmoideal, que se caracterizó por un período de crecimiento lento hasta el séptimo día y luego un período de rápido crecimiento entre siete y 21 días.

Resultados similares con relación a la mejor respuesta de la densidad celular del 3% de VCS fue obtenida por López (2006) al estudiar la curva de crecimiento en suspensiones celulares del cv. 'Navolean' (grupo AAB), con un incremento de biomasa celular (0,474 mL) a los 23 días de cultivo. Esta misma densidad celular fue utilizada para la multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar 'Zanzibar', (también del grupo AAB) por Alemán (2012).

Con relación a las demás curvas estudiadas al 6% y 9% de VCS independientemente de que disminuye en el tiempo la cantidad de biomasa celular, también disminuye la calidad de la suspensión celular al ser necesario incrementar el número de subcultivos a realizar. Con relación a esto Georget. *et al.* (2000), plantearon que la calidad de una SCE disminuye con el número de subcultivos, lo cual incrementa la probabilidad de contaminación y una disminuida

tasa de crecimiento y capacidad de regeneración, debido entre otros factores a la invasión de las células densas de rápido crecimiento ricas en almidón.

5.3. Formación de los embriones somáticos

Dhed'a *et al.* (1991) en el cv. 'Bluggoe' (ABB) obtuvieron formación de embriones somáticos en el medio de cultivo RD1 líquido, a partir de suspensiones celulares, pero no hicieron mención al número de embriones somáticos formados. Schoofs (1997), a partir de suspensiones celulares de plátanos obtuvo de 10^2 a 10^4 embriones somáticos por mL de VCS en medio de cultivo RD1 semisólido, sin hacer referencia a la densidad celular empleada, ni al efecto de la misma en la fase de formación de los embriones somáticos.

Otros autores, con el uso de densidades celulares entre el 10,0 y 15,0% de VCS, obtuvieron buenos resultados en la formación de los embriones somáticos, entre ellos, Côte *et al.* (1996), ajustaron la suspensión celular al 10% del VCS y transfirieron 1,0 mL a una placa Petri con un medio de cultivo semisólido designado como M3, después de 80 días de cultivo se formaron $370\ 000 \pm 65\ 000$ embriones somáticos.

Barranco, (2000) en el cultivar 'Gran Enano' (AAA), con el empleo del 15% de VCS, logró el proceso de histodiferenciación en medio de cultivo líquido y formar $2561,5 \pm 95,3$ embriones somáticos.

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 es bajo, destacan que dentro de las señales que resultan en la formación de los embriones somáticos, la densidad celular es de gran importancia. Sin embargo, en *Musa* no existen

trabajos que traten el efecto de la densidad de inóculo en las diferentes etapas del proceso de la embriogénesis somática (Barranco, 2001).

Strosse *et al.* (2003), señalaron la necesidad de establecer criterios comunes para la evaluación del desarrollo de las diferentes fases en la embriogénesis somática de los plátanos y bananos, que puedan facilitar su estudio comparativo con otras metodologías aplicadas con el mismo objetivo. Además, es importante tener en cuenta que para facilitar la formación y la sincronización de los embriones somáticos es necesario tamizar los agregados celulares y lavar éstos antes de su inoculación, para eliminar residuos del medio de cultivo anterior (Arnold *et al.*, 2002).

Cabrera *et al.* (2002) cuando utilizaron la metodología de Dhed'a *et al.* (1991), en el cv. 'Navolean', obtuvieron los resultados más favorables en el número de embriones somáticos formados en las densidades de células entre el 9,0 y 15,0% de volumen de células sedimentadas, tanto para el medio de cultivo líquido como para el medio de cultivo semisólido.

Otros autores como García-Águila *et al.* (2010) lograron un 86,4% de formación de embriones somáticos a la densidad de 1,5 gMF de inoculación en el cv. 'FHIA-21'.

Chong *et al.* (2005) al estudiar varias densidades celulares para la formación de los embriones somáticos, obtuvieron diferentes cantidades de embriones somáticos, lo cual pudo estar influenciado por los diferentes potenciales embriogénicos de las líneas celulares estudiadas, todo lo cual corrobora los resultados obtenidos en las tres líneas de suspensiones celulares estudiadas en la investigación realizada.

5.4. Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación

Los embriones somáticos en etapa globular no están preparados para germinar y por tanto necesitan ser colocados en un medio específico para favorecer su maduración y la correcta acumulación de las sustancias de reserva (Suárez-Castellá *et al.*, 2012).

La etapa de maduración es el período en el desarrollo del embrión donde ocurre la expansión de la célula y la acumulación de sustancias de reserva (Corredoira *et al.*, 2003).

Daniels *et al.* (2002) en el cv. 'FHIA – 21' (*Musa* AAAB) durante la etapa de maduración de los embriones somáticos observó que la densidad celular y el tiempo de permanencia en el medio de cultivo de maduración influyen en el número de los embriones somáticos germinados, lo cual pudo ser corroborado en la presente investigación. Además, este mismo autor encontró que los embriones somáticos formados al 15% de densidad celular, después de 20 y 30 días de permanencia en el medio de cultivo de maduración lograron una germinación de 81,5 y 82,5% respectivamente.

Cabrera (2002) demostró que en el cv. 'Navolean' (ABB) es indispensable colocar los embriones somáticos (en etapa globular) por 30 días en el medio de cultivo de maduración para lograr buenos resultados en su germinación. Este mismo autor observó que cuando los embriones somáticos permanecieron menos tiempo en el medio de cultivo de maduración, se demoró mucho más el comienzo de la germinación.

Sin embargo, Barranco (2001) en el cv. 'FHIA – 18' (AAAB) al utilizar densidades de embriones somáticos entre 0,4 y 0,8 gMF en 30 mL de medio de cultivo observó una rápida maduración, la cual ocurrió entre 15 y 22 días de cultivo.

López (2006) en estudios realizados sobre la interacción de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos y el tiempo de incubación en el medio de cultivo de maduración en el cv. 'Navolean' obtuvo que la mejor combinación fue la densidad de 0,5 gMF de embriones durante 30 días de cultivo, logrando un porcentaje de germinación de 46,80%. Fue comprobado además por este autor, que cuando los embriones somáticos no fueron cultivados previamente en el medio de cultivo de maduración, sólo germinó el 18,60% de los mismos.

Dhed'a *et al.* (1991) señalaron porcentajes de germinación de 10 a 23% en el cultivar 'Bluggoe' (ABB) cultivado de meristemas. Marroquín *et al.* (1993) lograron porcentajes de germinación de 20 a 36% en *Musa acuminata*. Mientras que Grapin *et al.* (1996a) obtuvieron en el plátano 'French Sombre' (ABB) porcentajes de germinación de 10 a 40%. Estos resultados son bajos en comparación con los que han logrado autores como Escalant *et al.* (1994) en diferentes cultivares y Navarro *et al.* (1997) en *Musa acuminata*, quienes obtuvieron entre 60 y 70% de germinación al utilizar el sistema de inmersión temporal (SIT) tipo RITA lo cual incremento la germinación de los embriones somáticos.

Barranco (2001) logró 40,6% de germinación en el cultivar híbrido 'FHIA – 18' en medio de cultivo semisólido; y Cabrera (2001) en el cv. 'Navolean' (ABB) con un 49,3% de germinación. Daniels *et al.* (2002) obtuvo porcentajes elevados de germinación (80,5%) de embriones somáticos del cultivar híbrido 'FHIA – 21' (*Musa* AAAB), formados en medio de cultivo semisólido, después de haberlos

mantenido durante 20 días en medio de cultivo M4 para la maduración de embriones somáticos.

Otros autores como Chong *et al.* (2005) señalaron que los niveles de germinación de los embriones somáticos en el cultivar 'Gran enano' logrados después de permanecer en medio de cultivo de maduración fueron de 80,5% como promedio, quienes establecieron las suspensiones celulares directamente en medio líquido sin pasar por una fase de callo.

Los resultados obtenidos en la maduración de los embriones somáticos por varios autores descritos anteriormente para incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos fue evidente en la presente investigación donde quedó demostrado el papel de la maduración del embrión somático sobre su germinación.

5.5. Conversión a plantas de los embriones somáticos

La eficiencia del proceso embriogénico de cualquier especie de plantas, está dada por la germinación y conversión de los embriones somáticos en plantas, etapas que constituyen requisitos indispensables (López, 2006).

Con relación a la supervivencia de las plantas obtenidas a partir de los embriones somáticos, en comparación con las plantas regeneradas por organogénesis, fue superior al 97%, similar a los resultados obtenidos por López (2006) al estudiar la conversión a plantas de embriones somáticos del cultivar 'Navolean'.

Con relación a la variación somaclonal en esta fase no se observó, lo cual corroboró lo planteado por Sandoval *et al.* (1997) al afirmar que en esta fase solamente se puede detectar alrededor de un 60% de variantes somaclonales, o sea que no quiere decir esto que no hayan estado presentes, sino que no fue

posible su observación visual, lo cual hace necesario continuar las evaluaciones de estas plantas en campo hasta completar su ciclo de desarrollo. Además de que cada genotipo responde diferente al método de regeneración aplicado. En el caso de las plantas derivadas de los embriones somáticos a partir del explante inicial de multiyemas, López (2006) observó un 0,5% de la variación somaclonal correspondiente a hojas variegadas, descrita por Reuveni e Israeli (1990) como “*axilares mosaic-like*” y señalan que esta variante representó el 10% de todas las variaciones.

Côte *et al.* (2000), durante la fase de aclimatización de plantas regeneradas de embriones somáticos en el cv. ‘Gran Enano’ (AAA) observaron hojas variegadas, que ocupó del 0,5 -1,3% de la población y señalaron además que cuando estas plantas fueron llevadas a campo desapareció esta anomalía morfológica, quizás debido a cambios epigenéticos ocurridos.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron la elaboración de una metodología (Fig.4) para el desarrollo de la embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares en el cultivar de plátano ‘FHIA – 25’. El explante inicial se obtiene de la multiplicación de los brotes establecidos *in vitro* en el medio de cultivo P5 (Dhed’a *et al.*, 1991) enriquecido con 0,2 mg.L⁻¹ de ancimidol (López 2006). Posteriormente el explante extraído es incubado en el medio de cultivo ZZ de composición líquida (Schoofs, 2007) y en agitación (90 rpm) durante 135 días para el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas, las cuales son multiplicadas al 3% de VCS. Los embriones somáticos son formados en el medio de cultivo RD1 (Dhed’a *et al.*, 1991) al 12% de VCS (semisólido) durante 45 días de incubación. La maduración de los

embriones somáticos se realiza en el medio de cultivo MS suplementado con $0,22 \text{ mg.L}^{-1}$ de zeatina (López 2006) durante 30 días, para que posteriormente germinen los embriones somáticos en el medio de cultivo propuesto por Gómez *et al.* (2000). Finalmente las plántulas obtenidas después de ser aclimatadas durante 60 días son transferidas a condiciones de campo.

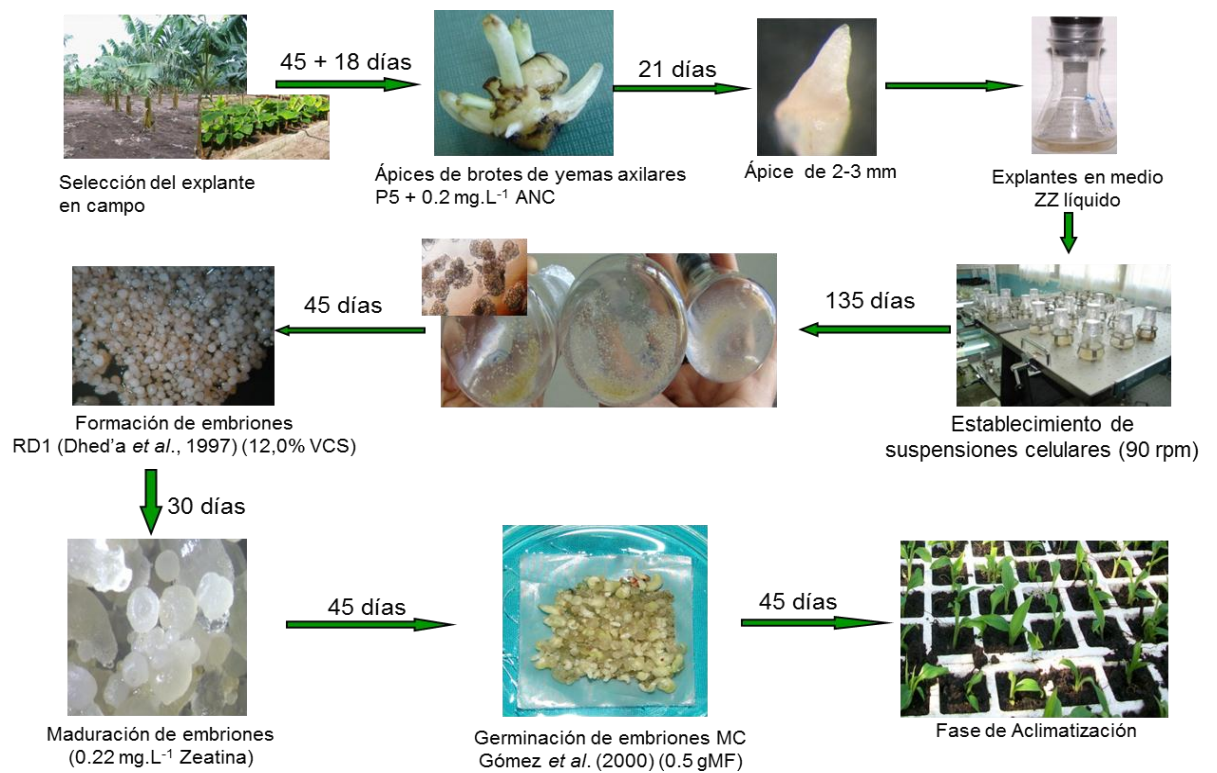


Figura 4. Esquema de trabajo para el desarrollo de la embriogénesis somática del cultivar 'FHIA - 25' (*Musa AAB*)

5. CONCLUSIONES

1. Se logró la regeneración de plantas del cv. 'FHIA – 25' vía embriogénesis somática, a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares, en medio de cultivo líquido sin pasar por la fase de callo.
2. Las suspensiones celulares establecidas posibilitaron la formación, maduración y germinación de los embriones somáticos.
3. La metodología desarrollada propició la conversión a plantas de los embriones somáticos con una supervivencia del 98% en la fase de aclimatización.

6. RECOMENDACIONES

1. Emplear la metodología desarrollada para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en el cv. de plátano 'FHIA – 25' (AAB).
2. Evaluar la respuesta de la metodología desarrollada en otros cultivares de plátano de interés para el mejoramiento genético y la propagación masiva.
3. Evaluar en campo la estabilidad genética de las plantas regeneradas por esta vía.

7. LITERATURA CITADA

- Akula, A., D. Becker y M. Bateson (2000): High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. **Plant Cell Reports**. 19: 1140–1145.
- Alemán-Rosquete, RA. (2012): Desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'Zanzíbar' (*Musa spp.*). Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Santa Clara, Cuba; 51p.
- Ammirato, P.V. (1973): Some effects of abscisic acid on the development of embryos from caraway cells in suspension culture. **Amer. J. Bot.** 60: 22-23.
- Ammirato, P.V. (1974): The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). **Bot. Gaz.** 135: 328-337.
- Anandarajah, K. Y B. McKersie (1990): Enhanced vigour of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with increased sucrose. **Plant Science**. 71: 261-264.
- Arnold, S., I. Sabalal, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova (2002): Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 69: 233–249.
- Attree, S.M., D. Moore, V.K. Sawhney y L.C. Fowke (1991): Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos: Effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. **Annals of Botany**. 68: 519-525.
- Baker, C.M., R.E. Durham, J.A. Burns, W.A. Parrott y H.Y. Wetzstein (1995): High frequency somatic embryogenesis in peanut *Arachis hypogaea* L. using mature, dry seed. **Plant Cell Reports**. 15, 38-42.

- Barranco, L.A. (2000): Desarrollo de la embriogénesis somática en medios líquidos (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano'). Tesis para optar al grado científico de Master en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara, Cuba; 57p.
- Barranco, L.A. (2001): Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. 'FHIA-18') empleando medios de cultivo líquidos. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba; 107p.
- Belalcázar, S. (1991): **El Cultivo del Plátano en el Trópico**. Instituto Colombiano Agropecuario. Cali, Colombia. 35-84 pp.
- Bradley, P.M., F. El-fiki y K.L. Giles (1984): Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. **Plant Sci. Lett.** 34: 397-401.
- Cabrera, M., J. López, R. Gómez, N. Montano, M. Reyes, D. Reynaldo, J.C Ventura, A. Santos, M. García, M. Basail y E. Espinosa (2002): Multiplicación, histodiferenciación y regeneración de Suspensiones Celulares Embriogénicas en plátano 'Navolean' (AAB). **Biotecnología Vegetal.** 2: 115-117.
- Cantliffe, D.J., J.R. Liu y J.R. Schultheis (1988): Development of artificial seeds of sweet potato for clonal propagation through somatic embryogenesis. En: W.H. Smith y J.R. Frank (eds.), **Methane from biomass a systems approach**. pp 183-195. Elsevier, New York.
- Chong, B., R. Gómez, M. Reyes, I. Bermúdez Carbaloso, J. Gallardo, M. Freire, L. Posada, I. Herrera y R. Swennen (2005): Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de 'Grande naine' (AAA). **InfoMusa.** 14(1):13-17.

- Corredoira, E., A. Ballester, y A.M. Vieitez (2003): Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. **Annals of Botany**. 92: 129-136.
- Côte, F., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson y J.V. Escalant (1996): Embryogenic cell suspensions from male flower of *Musa* AAA cv. "Grand Naine". *Physiol. Plant*. 97: 285-290.
- Côte, F., M. Folliot, R. Domergue y C. Dubois (2000): Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grand Naine). **Euphytica**. 112: 245-251.
- Cronauer, S.S. y A.D. Krikorian (1983): Somatic embryos from cultured tissue of triploid plantains (*Musa* ABB). **Plant Cell Reports**. 2: 289-291.
- Cronauer, S. y A.D. Krikorian (1988): Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seed diploid banana *Musa ornata* Roxb. **Plant Cell Reports**. 7: 23-25.
- Daniells, J., C. Jenny, D. Karamura y K. Tomekpe (2001): **Musaloge: a catalogue of *Musa* germoplasma. Diversity in the genus *Musa***. En: A. y S. Sharrock (eds.) INIBAP, Montpellier, France. 209pp.
- Daniels, D., R.G. Kosky y M.R. Vega (2002): Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar FHIA-21 (*Musa* sp. AAAB group). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 38: 330-333.
- Daniels, 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). Tesis presentada en opción al grado científico

de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Instituto de Biotecnología de Plantas, Santa Clara, Cuba. 123p.

Das, M., H. Chauhan, A. Chhibbar, Q.M.R. Haq y P. Khurana (2011): High efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotic. **Transgenic Res.** 20: 231-246.

De Jong, A., E.D. Schmidt y s.c. De Vries (1993): Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology.* 22: 367-377.

Dhed'a, D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke y E. De Langhe (1991): Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). **Fruits.** 46: 125-135.

Escalant, J.V. y C. Teisson (1989): Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. **Plant Cell Reports.** 7: 665-668.

Escalant, J.V., C. Teisson y F. Côte (1994): Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 181-186.

Escalant, J.V. y S.M. Jain (2004): Banana improvement with cellular and molecular biology, and induced mutations: Future and perspectives. En: S.M. Jain y R. Swennen (eds), **Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations.** pp. 359-367. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.

ESTADÍSTICAS FAO. 2011. FAOSTAT | © FAO Dirección de Estadística 2013 |

15 marzo 2013.

- Evans, D. W. Sharp y C. Flick (1981): Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: T.A. Thorpe (ed.), **In Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture**. pp. 45-113. Academic Press, New York.
- FHIA 2002. <http://www.fhia.hn>
- Fuji, J., D. Slade, R. Olsen, S. Ruzin y K. Redenbaugh (1990): Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. **Plant Science**. 72: 93-97.
- Fujimura, T. y A. Komamine (1980): Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Z. Pflanzenphysiol**. 99:1-8.
- García-Águila, L., R. Gómez, Y. Alvarado-Capó, Z. Sarría y M. Reyes (2010): Effect of inoculum density on formation and morphology of plantain somatic embryos (*Musa* spp. AAAB, cv. Hybrid 'FHIA-21'). **Rev. Colomb. Biotecnol**. 12(2): 240-247.
- Georget, F., F.Côte, R. Domergue y N. Ferrière (2000): Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. 'Grande naine') embryogenic cell suspension. **Plant Cell Reports**. 19: 748-754.
- Gómez, R. (1998): Cultivo de Células y Tejidos. En: J.N. Pérez (ed.) **Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología**. pp. 25-44. IBP, Santa Clara.
- Gómez, R., T. Gilliard, L.A. Barranco y M. Reyes (2000): Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido 'FHIA18' (AAAB). **Infomusa**. 9(1): 12-16.

- Kosky, R.G., M. De Feria, L.P. Posada, T. Gilliard, F.M. Bernal, M.V. Reyes, M.M. Chávez, E.M. Quiala (2012): Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 68: 21-26.
- Grapin, A., J. Schwendiman y C. Teisson C. (1996): Somatic embryogenesis in banana plant. **In Vitro Cell Dev. Biol.** 32: 66-71.
- Grapin, A., J.L. Ortíz, R. Domergue, J. Babeau, S. Monmarson, J.V. Escalant, C. Teisson y F. Côte F (1998): Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flower of *Musa* spp. **INFOMUSA**. 7(1):13-15.
- Grapin, A., J.L. Ortíz, T. Lescot, N. Ferrière y F. Côte (2000): Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain (*Musa* AAB). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 61: 237-244.
- Ibaraki y K. Kurata (2001): Automation of somatic embryo production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 65: 179–199.
- Ivanova, A., M. Velcheva, P. Denchev, A. Atanassov, H.A. Van, H.A. Onckelen (1994): Endogenous hormone levels during direct embryogenesis in *Medicago falcata*. **Physiologia Plantarum**. 92: 85-89.
- Kamle, M., A. Bajpai, R. Chandra, S. Kalim y R. Kumar (2011): Somatic embryogenesis for crop improvement. **GERF Bull. Biosc.** 2(1):54-59.
- Kärkönen, A. (2000): Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 61: 205–214.

- Khalil, Said M. y A.A.M. Elbanna (2002): Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration via suspension cultures of banana (*Musa* spp.). **Arab J. Biotech.** 7(1): 99-110.
- Krikorian, A.D. y M.E. Scott (1995): Somatic embryogenesis in bananas and plantain (*Musa* Clones and Species). En: Y.P. Bajaj (ed.), **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Protoplasts and Genetic Engineering** VI. pp. 183-19, Springer, Berlin Heidelberg, Alemania.
- Krishnaraj, S. y I.K. Vasil (1995): Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: T.A. Thorpe (ed.), **In vitro embryogenesis in plants.** pp. 417– 470. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Lee, K., H. Jeon y M. Kim (2002): Optimization of a mature embryo-based *in vitro* culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 71: 237–244.
- Lentfer, C.J. y R. Green (2004). Phytoliths and the evidence for banana cultivation at the Lapita–Rakival site on Watom Island, Papua New Guinea. En: **A Pacific Odyssey: Archaeology and Anthropology in the Western Pacific.** pp75-78. Paper in Honour of Jim Specht, (ed.) Val Attenbrow and Richard Fullgar.
- Lerma, S.L., A. Acuña, A.S. Riveros y J.A. Sandoval (2002): Tasa de multiplicación y potencial de regeneración de embriones somáticos de una suspensión celular de bananos (*Musa* AAA cv. 'Gran enano'). **Infomusa.** 11(1): 38-44.
- López, M. (1989): **El plátano.** Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 210p.

- López, J. (1999): Genetic improvement of *Musa* spp. by *in vitro* mutational plant breeding. **Infomusa**. 8: 2 - *PROMUSA XV*.
- López, J. (2006): 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, Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Ciego de Ávila, Cuba, 100p.
- López, J., V. Medero, A. Rayas, A. Santos, R. Gómez, M. Basail, J. Ventura y M. Rodríguez (2011): Escalado en Biofábrica de la propagación por embriogénesis somática del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30'. Logros del MINAG. Código: 4-ID-131. 12p.
- Marroquin, C.G., C. Paduscheck, J.V. Escalant y C. Teisson (1993): Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. ***In vitro Cell. Dev. Biol.*** 29: 43-46.
- Merkle, S., W. Parrott y B. Flinn (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: T.A. Thorpe (ed.), ***In vitro Embryogenesis in plants***. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. pp. 155-203.
- Michielse, C.B., P.J.J. Hooykaas, C.A.M.J.J. van den Hondel, A.F.J. Ram (2005): Agrobacterium mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. ***Curr. Genetics***. 48: 1-17.
- Murashige, T. y F.Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiol Plant***. 15: 473-497.
- Natesh, S. y M.A. Rau (1984): The embryo. En: B.M. Johri (ed.), ***Embryology of Angiosperms***. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; pp. 377-344.

- Navarro, C., R.M.Escobedo y A. Mayo (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.
- Nomura, K. y A. Komamine (1995): Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. En: T.A. Torpe (ed.), ***In vitro* Embryogenesis in Plants**. pp. 249-265. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Novak, F.J., R. Afza, M.V. Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Conger y X. Tang (1989): Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). **BioTechnology**. 7: 154-159.
- Onay, A., C.E. Jeffree, C. Theobald y M.M.Yeoman (2000): Analysis of the effects of maturation treatments on the probabilities of somatic embryo germination and plantlet regeneration in pistachio using a linear logistic method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 60: 121–129.
- Osuga, K. y A. Komamine (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. Y A. Komamine (1994): Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell culture systems. **Int. J. Dev. Biol.** 38: 287-299.
- Osuji, J.O. (1997): Multivariate pattern of quantitative tract variation in triploid banana and plantain cultivars. **Scientia Horticulturae**. 71: 197-202.
- Parrott, W., G. Dryden, S. Vogt, D. Hildebrand, G. Collins y E. Williams (1988): Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean.

***In vitro* Cell. Dev. Biol.** 24: 817-820.

Parrott, W. (1993): Cell-culture Techniques: Cell Culture, *In vitro* Selection, and Somaclonal Variation. En: **Proceeding Biotechnology applications for banana and plantain improvement.** pp. 183-191. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica).

Pérez, J.N., D. Agramonte, F. Jiménez y D. Ramírez (1999): Informe Final del Proyecto "Desarrollo y perfeccionamiento de la propagación masiva en las fases III y IV, enraizamiento y adaptación en caña de azúcar, papa, plátanos y bananos y adaptación de semillas artificiales en caña de azúcar" **IBP**, Santa Clara, Cuba; 82p.

Perea, M. (2001): La biotecnología como soporte en el mejoramiento de las Musáceas. En: M. Perea (ed.), **Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas.** pp. 139-149. Biotecnología Agrícola, Bogotá.

Pillay, N., D.C. Nwakanma y A. Tenkouano: (2000) Identification of RAPD markers to A and B genome sequences in Musa L. **Genome.** 43:763-767.

Preil, W. (1991): Application of bioreactors in plant propagation. En: P.C. Debergh y H. Zimmermann (eds.), **Micropropagation, Technology and Applications.** pp. 425-445. Kluwer Academic Publishers, London.

Reinert, J. (1958): Über die konholle der morphogeneses und die induktion von adventivembryomen und gewebekulturen aus kastofel. **Planta.** 58: 318-33.

Reuveni, O. y Y. Israeli (1990): Measures to reduce somaclonal variation *in vitro* propagated bananas. **Acta Horticulturae.** 257: 307-313.

- Reuveni, O., Y. Israeli y S. Golubowicz (1993): Factor influencing the occurrence of somaclonal variation in micropropagated bananas. **Acta Horticulturae**. 336: 357-384.
- Reynolds, J.F., y T. Murashige (1979): Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. **In vitro**. 5: 383-387.
- Roberts, D.,B. Flinn, D. Webb, F. Webster y B. Sutton (1990): Abscise acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. **Physiol. Plant**. 78: 355-359.
- Rodríguez, S. (2000): Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca plátanos y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos de la producción (FAP) y su manejo integrado. Informe final Proyecto 00200091, INIVIT, Programa Nacional de Mejoramiento Genético.96p.
- Sánchez, R., J.A. Pino, C. Vallin, M.E. Pérez, Iznaga y F. Malpartida (2002): Effects of the natural fungicide F20 on black Sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain (AAB) and banana (AAA).**Infomusa**. 11(1):14-16.
- Sandoval, J.A., L. Pérez y F. Côte (1997): Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano'). **CORBANA**. 22(48): 41-60.
- Sannasgala, K. (1989). *In vitro* somatic embryogenesis in *Musa* spp. Thesis Ph.D. K.U. Leuven, Belgium. 172p.
- Sarasan, V., A.V. Roberts y G.R. Rout (2001): Methyl laurate and 6-benzyladenine promote the germination of somatic embryos of a hybrid rose. **Plant Cell Reports**. 20:183–186.

- Schoofs, H. (1997): The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thesis Ph.D. K. Leuven, Belgium. 257p.
- Schoofs, H., B. Panis, H. Strosse, A. Mayo, J. López, N. Roux, J. Dolezel y R. Swennen (1999): Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. **Infomusa**. 9(2): 3-6.
- Schuller, A., R. Kirchner-Neß y G. Reuther (2000): Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 60: 23–31.
- Senaratna, T., B. Mekersie y S. Bowler (1990): Artificial seeds of alfalfa *Medicago sativa* L. induction of desiccation tolerance in somatic embryos. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 3: 16-85.
- Shigeta, J., K. Sato y M. Mii (1996): Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. **Plant Science**. 115: 109-114.
- SIGMA. 1991: Catalogue Sigma Chemical Company. USA.
- Steward, F.C., M.O. Mapes y J. Smith (1958): Growth and organized development of cultured cells. **American Journal of Botany**. 45: 693-704.
- Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalanty, F. Côte (2003): Banana and plantain embryogenic cell suspensions. **Technical Guidelines 8**. INIBAP, Montpellier, France. 36p.

- Stuart, D.A. y S.G. Strickland (1984): Embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa*. The role of aminoacid additions to the regeneration medium. **Plant Science Lett.** 34: 74-81.
- Suárez-Castellá, M., R. G. Kosky, B. Chong-Pérez, M. Reyes, L. García-Águila, Z. Sarría, P.Orellana, A. Rodríguez, R. Triana, Z. Pérez, M. González, M. León, B. Perez (2012): Estrategia de innovación tecnológica para el empleo de embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido en *Musa spp.* y su impacto económico. *Biología Vegetal*. 12(1): 41 – 48.
- Trang, B. y T. Thanh (2004): Crecimiento de las suspensiones celulares del cv. 'Cau man'. **Infomusa**. 13(1): 2-4.
- Vasil, I.K. (1988): Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. **Biotechnology**. 6: 397-402.
- Viñas, M. y V.M. Jiménez (2011): Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). **Rev. Colomb. Biotecnol.** 13(2): 229-242.
- Wetherell, D.F. (1984): Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 3: 221-227.
- Wong, W.C., M. Jalil, Ong-Abdullah, R.Y. Othman y N. Khalid (2006): Enhancement of banana plant regeneration by incorporating a liquid based embryo development medium for embryogenic cell suspension. **Journal Horticultural Science & Biotechnology**. 81(3): 385-390.

Yeung, E.C. (1995): Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. En: T.A. Thorpe (ed.), ***In vitro embryogenesis in plants***. pp. 247-253. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands.