

PROPAGACIÓN POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DEL CULTIVAR DE PLÁTANO BURRO 'INIVIT PB-2012' EN LA BIOFÁBRICA DE LAS TUNAS

Ana Ramona García Nuñez¹, Jorge López Torres^{2*}, Karel Ismar Acosta Pérez³, Aymé Rayas Cabrerar², Yoel Beovides²

¹Biofábrica, UEB Semillas, Las Tunas.

²Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6 Santo Domingo, Villa Clara, CP 53000, Cuba.

³Facultad de Ciencias Técnicas y Agropecuarias, Las Tunas.

* Autor para la correspondencia: lab.cell.biotech@inivit.cu y jorgelopezt2016@gmail.com.

RESUMEN

Los plátanos y bananos constituyen una fuente importante de alimento para millones de personas en países tropicales en vías de desarrollo, donde la fruta es un componente importante en la dieta. En Cuba, su cultivo tiene una alta prioridad en el programa alimentario nacional, debido a su capacidad de producir durante todo el año, alta demanda y su diversidad de uso. Sin embargo, la disponibilidad de material de plantación procedente de hijos, así como los producidos en las biofábricas usando la propagación por organogénesis resulta insuficiente para satisfacer las demandas de los agricultores. La investigación se realizó con el objetivo de disponer de una alternativa más eficiente para complementar la propagación por organogénesis. El estudio consistió en escalar la propagación por embriogénesis somática del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012' desde un laboratorio de investigación hasta la biofábrica. En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales se obtuvieron los embriones somáticos, los cuales fueron transferidos en su etapa de maduración a la biofábrica donde se propagaron los mismos durante tres subcultivos de germinación y posteriormente se evaluaron en la fase de aclimatización. Los resultados alcanzados posibilitaron el escalado de la propagación por embriogénesis somática a la biofábrica, posibilitando 1321,5 embriones somáticos germinados por cada contenedor (magenta) utilizada durante tres subcultivos de germinación. La conversión a plantas en las condiciones *ex vitro* fue superior al 94,0 % y solo se observó 0,5 % de variantes somaclonales.

Palabras clave: Embrión somático, propagación *in vitro*, suspensiones celulares embriogénicas

PROPAGATION BY SOMATIC EMBRYOGENESIS OF THE BURRO PLANTAIN CULTIVAR 'INIVIT PB-2012' AT THE LAS TUNAS BIOFACTORY

ABSTRACT

Bananas and plantains are an important source of food for millions of people in tropical developing countries, where fruit is an important component of the diet. In Cuba, their cultivation has a high priority in the national food program, due to their year-round production capacity, high demand and diversity of use. However, the availability of

planting material from offspring, as well as those produced in biofactories using organogenesis propagation is insufficient to meet the demands of growers. The research was conducted with objective of having a more efficient alternative to complement organogenesis propagation. The study consisted of scaling up somatic embryogenesis propagation of blugooe cultivar 'INIVIT PB-2012' from a research laboratory to biofactory. Somatic embryos were obtained at the Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales and transferred in their maturation stage to the biofactory where they were propagated during three germination subcultures and subsequently evaluated in the acclimatization phase. The results achieved allowed the scaling up of propagation by somatic embryogenesis to the biofactory, resulting 1321.5 somatic embryos germinated per container (magenta) used during three subcultures of germination. The conversion to plants under ex vitro conditions was over 94.0 % and only 0.5 % of somaclonal variants were observed.

Keywords: Somatic embryo, *in vitro* propagation, embryogenic cell suspensions.

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) constituyen un alimento fundamental para más de 400 millones de personas alrededor de todo el mundo, ocupando el cuarto lugar dentro de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial (Rustagi *et al.*, 2019).

En Cuba, su cultivo representa una alta prioridad para el programa alimentario nacional, debido a su alta tasa de consumo per cápita, diversidad de usos y capacidad de producción durante todos los meses del año (Álvarez, 2011).

Todo lo cual hace que sea necesario disponer de alternativas más eficientes para su multiplicación *in vitro* que pueda complementar la propagación por organogénesis (ápices meristemáticos) (Yi *et al.*, 2014; García-Águila *et al.*, 2017). El empleo de la embriogénesis somática como método de propagación permite obtener mayor volumen de propágulos en un menor período de tiempo y a un costo más bajo. Todo esto trae consigo que su uso sea potencialmente más eficiente que la propagación por organogénesis (Tumuhimbise y Talengera, 2018): además de constituir una herramienta auxiliar para la mejora genética de este cultivo (Kumaravel *et al.*, 2019).

Su aplicación práctica en la propagación masiva de plantas a nivel de biofábricas en este cultivo ha quedado demostrada por varios autores, no solo por su eficiencia como método de propagación sino por la buena estabilidad genética de las plantas producidas (Suárez-Castellá *et al.*, 2012; López *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó la investigación con el objetivo de escalar la propagación por embriogénesis somática del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB 2012' a la biofábrica de Las Tunas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló con el cultivar de plátano burro 'INIVIT PB 2012' en dos etapas, la primera en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), donde se realizó la inducción del proceso embriogénico (formación de los callos con estructuras embriogénicas), el establecimiento y multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas (SCE) y la formación y maduración de los embriones somáticos.

Posteriormente, la segunda etapa, se fue en la biofábrica de Las Tunas donde se realizó la germinación y conversión de los embriones somáticos en planta.

Para inducir la embriogénesis somática se utilizaron agregados florales inmaduros de la inflorescencia masculina (pámpanas). Estas se tomaron cuando se habían abierto ocho brácteas después de la última flor femenina. Las mismas fueron colocadas en el medio de cultivo M1 (Escalant *et al.*, 1994) durante cuatro meses y se incubaron en la oscuridad a la temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ para la formación de callos con estructuras embriogénicas.

El medio de cultivo utilizado estuvo constituido por las sales y vitaminas del medio de cultivo MS (1962) (Murashige y Skoog, 1962) referido en lo adelante como medio de cultivo basal, suplementado con sacarosa ($30,0 \text{ g.L}^{-1}$), glutamina ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), AIA (Ácido indolacético) ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), ANA (Ácido Naftalenacético) ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), y pH de 5,8. Gelificado con gelrite ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$).

Luego de obtenidas las estructuras embriogénicas, se establecieron y multiplicaron las SCE en el medio de cultivo M2 (Côte *et al.*, 1996) y se colocaron en un agitador orbital INFORS (HT) con agitación constante (80 r.p.m) y en condiciones de oscuridad a temperatura de $27 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

El medio de cultivo estuvo constituido por el medio basal, suplementado con sacarosa ($45,0 \text{ g.L}^{-1}$), glutamina ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), extracto de malta ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), 2,4-D ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), y pH de 5,8 en estado líquido.

Para lograr la formación de los embriones somáticos se inoculó una gota de SCE al 25 % del VCS en el medio de cultivo RD1 (Dhed'a *et al.*, 1991). Para lo cual se adicionaron cuatro gotas de SCE, separadas unas de otras por placas de Petri ($80 \times 15 \text{ mm}$) con 15 mL del medio de cultivo basal reducido al 50 % de los macronutrientes y suplementado con sacarosa (30 g.L^{-1}), sin reguladores del crecimiento y pH de 5,8. Gelificado con gelrite ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$). Las condiciones de cultivo utilizadas fueron 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 $62\text{-}68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Maduración de los embriones somáticos

Con el objetivo de determinar la calidad de los embriones somáticos para su escalado a la biofábrica, se evaluó su maduración como criterio para la selección de los mismos.

Se tomaron 50 embriones somáticos formados de cada línea de SCE obtenida (cuatro líneas), los cuales fueron colocados en cinco magentas (10 embriones somáticos por magenta) que contenían el medio de cultivo de maduración de embriones (Gómez *et al.*, 2000) durante 30 días de cultivo. El mismo estuvo constituido por el medio de cultivo basal suplementado con sacarosa (45 g.L^{-1}), biotina ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), AIA ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), 6-BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) y pH de 5,8. Gelificado con gelrite ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$). Las condiciones de cultivo fueron temperatura $27 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e incubados a la oscuridad.

Transcurrido el tiempo de incubación para su maduración, se tomó como criterio de embrión somático maduro cuando éstos emitieron brotes y raíz al ser colocados a germinar en medio de cultivo de germinación (Gómez *et al.*, 2000) durante 30 días de cultivo. El mismo estuvo constituido por el medio de cultivo basal suplementado con sacarosa (30 g.L^{-1}), biotina (1 mg.L^{-1}), AIA ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), 6-BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) y pH de 5,8.

Gelificado con gelrite (2,0 g.L⁻¹). Las condiciones de cultivo utilizadas fueron similares a las descritas para formación de los embriones somáticos.

Se evaluó el número de embriones somáticos que germinaron a los 30 días de colocados a germinar y posteriormente se calculó el porcentaje que esto representó.

Para el análisis estadístico, se compararon los resultados mediante la prueba de Chi-cuadrado y se consideró significativo si $p \leq 0,05$.

Escalado de los embriones somáticos a la biofábrica

Para lograr el escado a la biofábrica de Las Tunas de los embriones somáticos obtenidos, fueron transferidos a la misma, embriones somáticos maduros de la línea celular número dos.

El objetivo de este experimento fue evaluar la cantidad de embriones somáticos germinados durante tres ciclos de germinación. Los cuales fueron incubados durante 30 días en el medio de cultivo de germinación.

Las condiciones de cultivo fueron temperatura $27 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e iluminación natural mediante la luz solar.

Transcurrido el tiempo de incubación para la germinación de los embriones somáticos, se evaluó la cantidad de embriones somáticos germinados por cada magenta inoculada, para lo cual se cuantificó la cantidad de los embriones somáticos germinados. Los embriones somáticos no germinados se colocaron a germinar nuevamente en el medio de cultivo de germinación hasta completar un total de tres ciclos de germinación, evaluándose a su vez la cantidad de embriones somáticos germinados.

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación múltiple de medias se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

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* (fase de adaptación climática) de las plantas producidas procedentes de cada uno de los tres ciclos de germinación estudiados en comparación con plantas propagadas por organogénesis del mismo cultivar objeto de estudio.

Las plantas utilizadas tenían una altura de 4 cm y tres hojas, las cuales fueron plantadas a una profundidad de un cm en bandejas de polieturano de 70 orificios, con un volumen de 100 cm³ de cachaza.

Se evaluó la supervivencia de las plantas (expresada en porciento) a los 15 días. Posteriormente, a los 60 días de aclimatización de las plantas se evaluaron las variables fenotípicas altura de la planta (cm), largo de la hoja (cm), ancho de la hoja (cm) y número de hojas a 60 plantas de cada uno de los tres ciclos de germinación de los embriones somáticos estudiados y su control.

La frecuencia de variantes fenotípicas (%), con respecto a las plantas normales, se evaluó al 100 % de la población, a los 60 días de la aclimatización, según la metodología propuesta por Sandoval *et al.*, (1997).

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de medias se aplicó la prueba T de

Student con un nivel de significación de $p \leq 0,05$. Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico *SPSS* ver. 25,0. En cada experimento se detallan las pruebas realizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa de la Investigación

A partir de la incubación de las inflorescencias masculinas se formaron los callos con estructuras embriogénicas a los cuatro meses de su incubación. Posteriormente a los dos meses se formaron las SCE que dieron origen a la formación de los embriones somáticos (Figura 1).

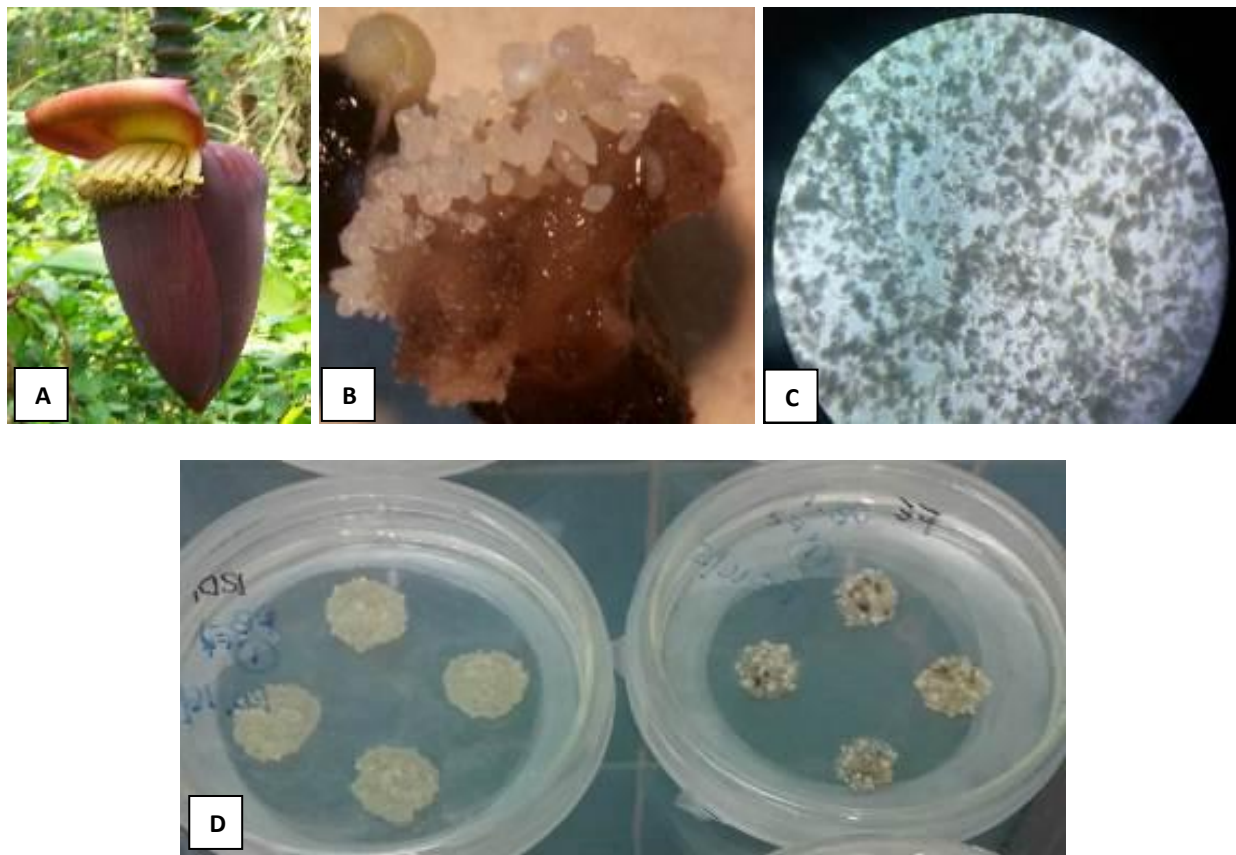


Figura 1. Formación de los embriones somáticos en el cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012' a partir de las suspensiones celulares embriogénicas. **A:** inflorescencia masculina, **B:** callo con embriones, **C:** suspensiones celulares embriogénicas y **D:** formación de embriones somáticos.

Maduración de los embriones somáticos

Al evaluar la calidad de los embriones somáticos producidos de cuatro líneas de SCE, se pudo observar (Tabla 1) que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de embriones somáticos maduros que germinaron cuando fueron colocados en el medio de cultivo de germinación.

Tabla 1. Porcentaje de embriones somáticos germinados a los 30 días de cultivo, previamente colocados a madurar del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012'

Línea celular	Embriones germinados (%)
1	40
2	46
3	36
4	32

$\chi^2=2,26$ ($p \leq 0,05$)

Durante el desarrollo del embrión, la maduración es un estado crítico para la conversión de los embriones en plantas, caracterizado por la diferenciación y expansión celular (López-Gómez *et al.*, 2016; Kumaravel *et al.*, 2017; Marimuthu *et al.*, 2019; Kumaravel *et al.*, 2020).

Los embriones somáticos maduros mostraron una invaginación de forma circular con el centro opaco (Figura 2) y la presencia de una zona meristemática densa, los cuales evolucionaron asimétricamente formando un domo apical con primordios de hojas y una región de corona por donde se desarrollaron las raíces iniciales, lo cual posibilitó su germinación, similares a las descritas por Dhed'a *et al.* (1991) en el cultivar 'Bluggoe', López (2006) en el cultivar 'Navolean' y García - Águila *et al.*, (2010), en el cultivar híbrido 'FHIA-21' (*Musa* AAAB). Otros estudios realizados por Enríquez-Valencia *et al.* (2018) y Enríquez-Valencia (2019) señalaron la expresión de genes, en particular la participación del gen TAR-2 durante el proceso de maduración de los embriones somáticos del cultivar 'Manzano' (*Musa* AAB, subgrupo Silk).

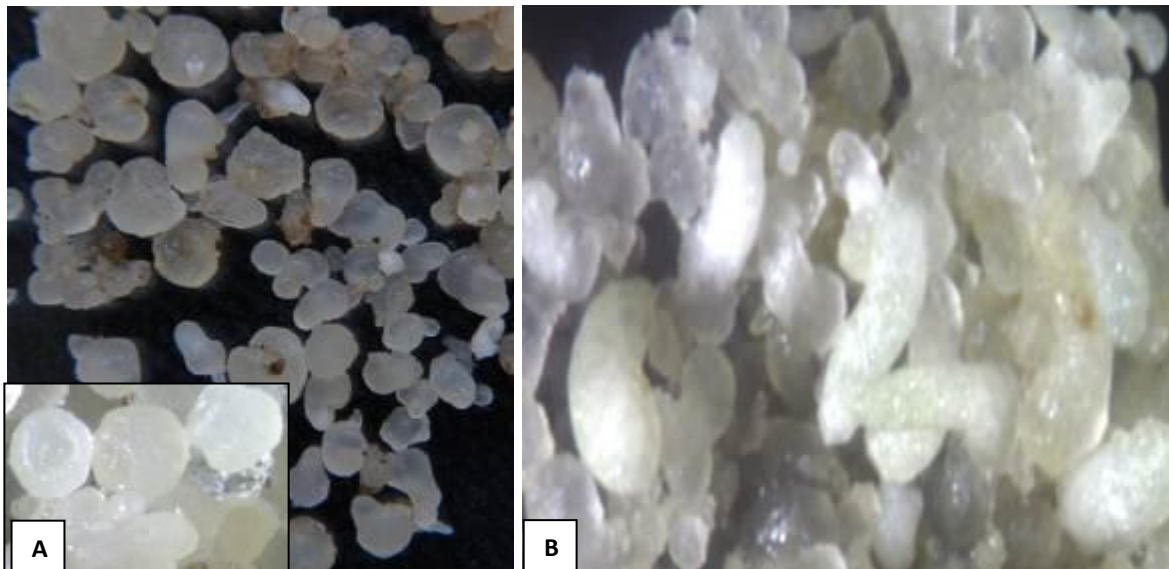


Figura 2. Embriones somáticos en fase de maduración (A) y germinación (B) a los 30 días de cultivo (100x) según medios de cultivo para cada fase, cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012'.

La maduración del embrión es una etapa crítica en los sistemas de regeneración *in vitro*, la cual se caracteriza por la expansión celular, la diferenciación (los cotiledones se expanden e inician el almacenamiento de compuestos de reserva en compartimento

subcelulares para su posterior movilización y uso), la desecación y acumulación de sustancias de reserva, lo cual promueve la correcta germinación de los embriones somáticos (Merkle *et al.*; 1995; Grapin *et al.*, 1996).

Los porcentajes de maduración obtenidos en la investigación realizada se corresponden a los alcanzados por varios investigadores al utilizar la embriogénesis somática en diferentes cultivares de *Musa* spp para la propagación comercial a escala de biofábricas tales como, 'Gran enano', 'Cavendish enano', 'FHIA-18', 'FHIA-21' (Suárez-Castellá *et al.*, 2012), 'CEMSA ¾' e 'INIVIT PV 06-30' (López *et al.*, 2013).

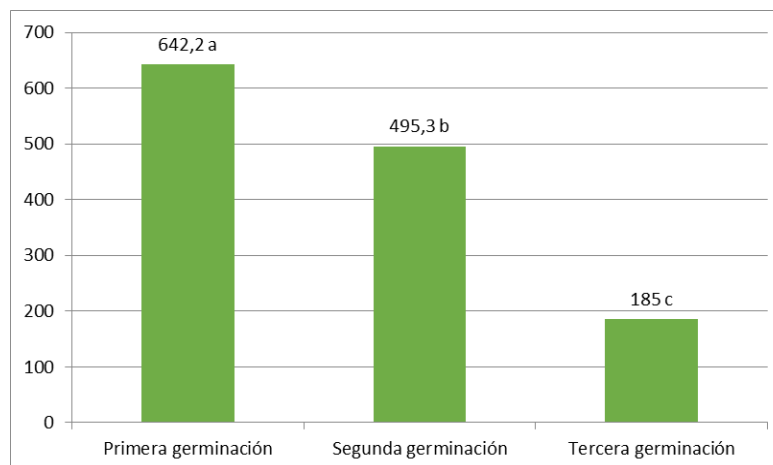
Los resultados obtenidos en el experimento realizado demostraron la buena calidad de los embriones somáticos producidos, aptos para su escalado a la biofábrica a partir de los embriones somáticos maduros, independientemente de la línea de suspensión celular que le dio origen, lo cual estuvo asociado a la buena calidad de las suspensiones celulares embriogénicas del cultivar objeto de estudio.

Segunda etapa de la Investigación

Escalado de los embriones somáticos a la biofábrica

La mayor cantidad de embriones somáticos germinados (Figuras 3 y 4) se obtuvo cuando los embriones fueron colocados en el primer cultivo de germinación (primera germinación) con un valor medio de 642,2 embriones somáticos germinados por magenta, con diferencias significativas de la segunda y tercera germinación, el cual disminuyó a medida que aumentaron los ciclos de germinación. En la segunda germinación germinaron 494,3 embriones somáticos y en la tercera germinación germinaron 185 embriones somáticos.

Luego de transcurrido los tres ciclos de germinación de los embriones somáticos evaluados, se obtuvo como media total 1321,5 embriones somáticos germinados por magenta. O sea, que la inoculación de una gota de suspensión celular (al 25 % del VCS) para formar embriones del cultivar objeto de estudio posibilitó disponer de embriones somáticos aptos para su conversión a plantas.



*Medias con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $p \leq 0,05$.

Figura 3. Cantidad de embriones somáticos germinados durante tres subcultivos de germinación en la biofábrica a los 30 días de cultivo del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012'.



Figura 4. Embriones somáticos germinados con presencia de brotes y raíces a los 30 días de cultivo en la biofábrica del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012'.

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática indirecta se caracteriza por un proceso asincrónico donde los embriones somáticos se encuentran en diferentes fases de desarrollo (Wójcikowska *et al.*, 2020), lo cual hace que sea necesario realizar más de un subcultivo de germinación para incrementar el número de plantas a producir. Aspecto que se evidenció en la investigación realizada, al ser necesario realizar más de un subcultivo de germinación para incrementar el número de plantas a producir.

Suárez-Castella *et al.* (2012) haciendo un análisis comparativo entre la embriogénesis somática en *Musa* spp. y la organogénesis, demostraron que se simplifica la manipulación del material vegetal en la cabina de flujo laminar por el personal, se disminuyen los porcentajes de contaminación microbiana, se reduce los gastos de personal, reactivos e insumos, se incrementa la productividad del trabajo en la cabina de flujo laminar, así como se requiere una inversión mínima de equipamiento para su empleo.

Otros autores (García-Águila *et al.*, 2017) al aplicar esta técnica para la propagación de plátanos y bananos lograron un incremento de la productividad del trabajo en cabina de flujo laminar al poder manipular de 5000-7000 explantes por operario, lo cual representó 487 % de incremento de la productividad del mismo, comparado con la propagación por organogénesis donde se logra de 1000-1230 explantes por operario.

Los resultados alcanzados en esta investigación demostraron la posibilidad de poder incrementar los coeficientes de multiplicación al utilizar este tipo de propagación en el cultivar objeto de estudio.

Los embriones producidos alcanzaron los parámetros de calidad establecidos para su transferencia a las condiciones *ex vitro*, establecidos para la propagación *in vitro* de los plátanos y bananos (altura 3-4 cm; 2-3 hojas y diámetro del pseudotallo 0,3-0,5 cm, con sistema radical desarrollado y color verde intenso) según el instructivo técnico para la fase de aclimatización de bananos y viandas (Cuba, 2018).

Conversión a planta 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 el porcentaje de supervivencia de las plántulas en la fase de aclimatización fue superior al 94,0 % en las tres germinaciones realizadas, primera, segunda y tercera respectivamente (94,5 %, 95 % y 94,5 %) y el control de organogénesis (94,0 %).

Con relación a la presencia de variantes somaclonales (datos no mostrados), la variación correspondiente a manchas irregulares de las hojas (hojas variegadas) fue de 0,4 % en las plantas obtenidas por embriones somáticos en la primera germinación. En el caso de las plantas derivadas de los embriones somáticos de la segunda y tercera germinación fue de 0,2 % y 0,5 % respectivamente para el mismo tipo de variante somaclonal. En las plantas regeneradas por organogénesis la aparición de esta variante fue del 0,2 %.

Según Reuveni e Israeli (1990) definieron este tipo de variación como “*axilares mosaic-like*” y que representó el 10,0 % de todas las variaciones somaclonales presentes en el género *Musa* spp. Por su parte, López (2006) señaló que la presencia de esta variación somaclonal durante la fase de aclimatización climática en el cultivar de plátano vianda ‘Navolean’, regenerado por embriogénesis somática fue observada en el primer ciclo de evaluación en campo.

Vizcaíno (2012), al evaluar los cambios fenotípicos de plantas propagadas por embriogénesis somática y organogénesis del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV 06-30’ (AAB), observó que en ambos sistemas de regeneración de plantas sólo fue observado 1 % de plantas atípicas (con hojas variegadas y con hojas coriáceas).

Transcurridos 60 días en esta fase, solo existieron diferencias significativas en la altura de la planta de la primera y segunda germinación de embriones (a favor de las plantas regeneradas por embriogénesis somática), en comparación con el control de organogénesis. El resto de las variables medidas no tuvo diferencias significativas (Tablas 2, 3 y 4). Todo lo cual evidenció la calidad de las plantas producidas por el método de regeneración de plantas de embriogénesis somática.

La fidelidad clonal es uno de los prerequisites más importantes en la propagación *in vitro* de cualquier especie de plantas (Souza *et al.*, 2016; Akbar 2011; Robooni y Talengera 2018; Vargas *et al.*, 2018).

Independientemente de los bajos porcentaje de variantes somaclonales observadas en la fase de aclimatización, es recomendado por otros investigadores (Gómez *et al.*, 2006; López, 2006), que resulta indispensable continuar con estos estudios hasta la fase de campo para poder estimar la frecuencia de variantes somaclonales totales de las plantas regeneradas por métodos biotecnológicos.

Los estudios realizados demostraron que es posible el escalado de la propagación por embriogénesis desde el laboratorio de investigación a la biofábrica en el cultivar objeto de estudio, avalado por los elevados coeficientes de multiplicación que se obtienen y la buena estabilidad genética de las plantas regeneradas.

De manera que la investigación realizada posibilitó la aplicación de la metodología desarrollada para la producción de materiales de plantación por embriogénesis somática a partir de un laboratorio de investigación hasta el laboratorio comercial (biofábrica).

Tabla 2. Comparación entre las plantas obtenidas por embriogénesis somática, primera germinación y organogénesis del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012' a los 60 días de aclimatización *ex vitro*.

Regeneración	Altura	Ancho hoja	Largo hoja	No. Hojas
Embriogénesis somática	40,1 a	9,55	26,05	5,0
Organogénesis	37,1 b	10,1	26,65	4,6

*Medias con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de T-Student para $p \leq 0,05$ (n=60).

Tabla 3. Comparación entre las plantas obtenidas por embriogénesis somática, segunda germinación y organogénesis del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012' a los 60 días de aclimatización *ex vitro*.

Regeneración	Altura	Ancho hoja	Largo hoja	No. Hojas
Embriogénesis somática	41,0 a	9,8	27,2	4,9
Organogénesis	38,0 b	10,0	26,90	5,1

*Medias con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de T-Student para $p \leq 0,05$ (n=60)

Tabla 4. Comparación entre las plantas obtenidas por embriogénesis somática, tercera germinación y organogénesis del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012' a los 60 días de aclimatización *ex vitro*.

Regeneración	Altura	Ancho hoja	Largo hoja	No. Hojas
Embriogénesis somática	39,2	8,55	25,75	4,9
Organogénesis	38,0	9,7	25,85	5,1

*Medias con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de T-Student para $p \leq 0,05$ (n=60)

CONCLUSIONES

1. Fue posible el escalado de la propagación por embriogénesis somática de un laboratorio de investigación a la producción en biofábrica, a través de la germinación y la conversión de los embriones somáticos en plantas.
2. Las plantas regeneradas por embriogénesis somática mostraron durante las condiciones *ex vitro* de aclimatización alta supervivencia y buena estabilidad genética.

BIBLIOGRAFIA

- AKBAR, A. 2011. Somatic embryogenesis through cell suspension culture in Indian commercial cultivars of Banana (*Musa spp.*) Dissertation. Bharathidasan University, India. 245p.
- ÁLVAREZ, J. M. 2011. *Compendio de las Musáceas*. Guerra, M.C. (Ed). La Habana, Cuba. 271p.

- CÔTE, F.; R. DOMERGUE; S. MONMARSON; J. SCHWENDIMAN; C. TEISSO and J. V. ESCALANT. 1996. Embryogenic cell suspensions from male flower of *Musa* AAA cv. "Grand Naine". *Physiol. Plant*, 97, 285-290.
- CUBA. MINISTERIO DE LA AGRICULTURA. 2018. Instructivo Técnico. Fase de Aclimatización de Bananos y Viandas. Dirección de Agricultura 26 p.
- DHED'A, D.; F. DUMORTIER; B. PANIS; D. VUYLSTEKE and E. DE LANGHE. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). *Fruits*, 46, 125-135.
- ENRÍQUEZ-VALENCIA, A.J.; F.A. VÁZQUEZ-FLOTA; J.R. KU-CAUICH and M.R. ESCOBEDO-GRACIA. 2018. Differentially expressed genes during the transition from early to late development phases in somatic embryo of banana (*Musa* spp. AAB group, Silk subgroup) cv. Manzano. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(2): 289-302.
- ENRÍQUEZ-VALENCIA, A. 2019. *Análisis fisiológico, bioquímico y molecular del desarrollo y maduración del embrión somático de Musa*. Tesis presentada en opción al título de Doctor en Ciencias. Mérida, Yucatán, México, 144p.
- ESCALANT, J.V.; C. TEISSON; F. and CÔTE. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 30, 181-186.
- GARCÍA-ÁGUILA, L.; R. GÓMEZ; Y. ALVARADO-CAPÓ; Z. SARRÍA and 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.
- GARCÍA-ÁGUILA, L.; E. ESPINOSA; Z. SARRIA and M. FREIRE. 2017. Escalado industrial de la tecnología de embriogénesis somática para la propagación masiva de plátanos y bananos en la red de Biofábricas de Cuba. Propuesta a premio nacional anual a la innovación tecnológica IBP UCLV 84p.
- GÓMEZ, R.; T. GILLIARD; L. A. BARRANCO and M. REYES. 2000. Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido 'FHIA 18' (AAAB). *Infomusa*, 9(1): 12-16.
- GÓMEZ, R.; L.A. BARRANCO; B. CHONG; D. DANIELS; M. REYES and M. De FERIA. 2006. Trueness-to-type and yield components of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' plants regenerated via somatic embryogenesis in a bioreactor. *Euphytica*, 150: 63-68.
- GRAPIN, A.; J. SCHWENDIMAN and C. TEISSON. 1996. Somatic embryogenesis in banana plant. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 32, 66-71.
- KUMARAVEL, M.; S. UMA; S. BACKIYARANI; M. SARASWATHI; M. M. VAGANAN; M. MUTHUSAMY and K. P. SAJITH, 2017. Differential proteome analysis during early somatic embryogenesis in *Musa* spp. AAA cv. Grand Naine. *Plant Cell Rep.*, 36, 163-178.
- KUMARAVEL, M.; S. UMA; S. BACKIYARANI and M. SARASWATHI. 2019. Molecular analysis of somatic embryogenesis through proteomic approach and optimization of protocol in recalcitrant *Musa* spp. *Physiologia Plantarum* 167, 282-301.
- KUMARAVEL, M.; S. UMA; S. BACKIYARANI; M. S. SARASWATHI, and M. MAYILVAGANAN. 2020. Antioxidant enzyme activities during somatic embryogenesis in *Musa acuminata* Colla (AAA group) 'Grand Naine' and *Musa* spp.

- (AAB group) 'Rasthali' *in vitro* cellular AND developmental Biology-Plant. doi:10.1007/s11627-019-10017-3.
- 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 Bioplantitas. Universidad de Ciego de Ávila. Ciego de Ávila, Cuba, 100p.
- LÓPEZ, J.; N. MONTANO; D. REINALDO; A. RAYAS; V. R. MEDERO; A. SANTOS and D. RODRÍGUEZ. 2013. Somatic embryogenesis for the production of plantain planting materials in Cuba. In: J. Ruane; J.D. Dargie; C. Mba; P. Boettcher; H.P.S. Makkar; D.M. Bartley AND H. Sonnino H (Eds) *Biotechnologies at work for smallholders: Case studies from developing countries in crops, livestock and fish*. (p 47-55) Publisher: FAO. ISBN 978-92-5-107877-8, Roma.
- LÓPEZ, J.; E. SANTOS-ORDOÑEZ and E. GONZÁLEZ. 2020. Chapter 3 Complementation of Bananas Conventional Breeding Programs Through Biotechnological Genetic Improvement. En Chong P. A., Newman, D. J. AND Steinmacher, D. A. (Eds.) *Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery*, Springer Nature Switzerland AG 25.
- LÓPEZ-GÓMEZ, P.; R. M. ESCOBEDO-GRACIA; M. YOUSSEF; A. J. ENRÍQUEZ-VALENCIA; L. IRACHETA-DON JUAN and R. KU-CAHUICH. 2016. Maduración y germinación *in vitro* de embriones somáticos de banano cv. 'Enano gigante'. *Revista del centro de graduados e investigación. Instituto Tecnológico Mérida*, 31(63): 51-53.
- MARIMUTHU, K.; U. SUBBARAYA; B. SUTHANTHIRAM and S. MARIMUTHU SOMASUNDARAM. 2019. *Molecular analysis of somatic embryogenesis through proteomic approach and optimization of protocol in recalcitrant Musa spp. Physiologia Plantarum*. doi:10.1111/pp1.12966.
- MERKLE, S.; W. PARROTT and B. FLINN. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (ed) *In vitro Embryogenesis in plants*. (pp 155-203) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- REUVENI, O. and Y. ISRAELI. 1990. Measures to reduce somaclonal variation *in vitro* propagated bananas. *Acta Horticulturae*, 257, 307-313.
- RUSTAGI, A.; S. SHEKHAR; D. KUMAR; K. LAWRENCE; V. BHAT and N. SARIN. 2019. High speed regeneration via somatic embryogenesis in elite Indian banana cv. Somrani monthan (ABB). *Vegetos*, 9p.
- SANDOVAL, J. A.; L. PÉREZ and 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.
- SOUZA, L.; J. A. SANTOS-SEREJO; E. PERITO; J. R. FERREIRA DE SANTANA; M. PASQUAL and S. DE OLIVEIRA. 2016. Somatic embryogenesis, cell suspension, and genetic stability of banana cultivars. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 52, 99-106.
- SUÁREZ-CASTELLÁ, M.; R. GÓMEZ; B. CHONG-PÉREZ; B. LEÓN; M. REYES and GARCÍA-ÁGUILA L. 2012. Estrategia de innovación tecnológica para el empleo de

- embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido en *Musa* spp. y su impacto económico. *Biotecnología Vegetal* 12(1): 41-48.
- TUMUHIMBISE, R. and D. TALENGERA. 2018. Improved Propagation Techniques to Enhance the Productivity of Banana (*Musa* spp.). *Open Agriculture*, 3: 138-145.
- VARGAS, J.L.O.; J.S. FERNÁNDEZ and M.E.A. VEGA. 2018. Regeneration of Plants from Embryogenic Cell Suspensions of cv. 'Datil' (*Musa* AA): Morphological Evaluation of Plants in the Field. *J. Agricult. Sci. and Techn*, 8, 29-41.
- VIZCAÍNO, R. 2012. Evaluación en campo del cultivar de plátano 'INIVIT PV 06-30' propagado por embriogénesis somática en Biofábrica. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, Villa Clara, Cuba, 50 p.
- WÓJCIKOWSKA, B.; A.M. WÓJCIK and M.D. GAJ. 2020. Epigenetic Regulation of Auxin-Induced Somatic Embryogenesis in Plants. *Journal Int. J. Mol. Sci*, 7(2307): 1-23.
- YI, W.; W. CHIN; M.S. MOHAMAD; B. CHIN and K. NORZULAANI. 2014. Evaluation of a laboratory scale conventional shake flask and a bioreactor on cell growth and regeneration of banana cell suspension cultures. *Scientia Horticulturae*, 172, 39-46.