

Oxidación en la inducción de la embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras de Gran Enano (*Musa* AAA)

Oxidation during the induction of somatic embryogenesis with immature male flowers of Grand Nain (*Musa* AAA)

Z. Villegas F.¹, C. Giménez A.¹, J. Vilchez P.², M. Moreno C.¹,
L. Sandoval ³ y M. Colmenares E.¹

¹Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia (LUZ), Maracaibo, Venezuela.

²Departamento de Botánica. ³Instituto de Investigaciones Agronómicas. Facultad de Agronomía. LUZ.

Resumen

Las bananas y plátanos (*Musa* spp.) son económicamente importantes a nivel mundial. Su mejoramiento clásico ha presentado limitaciones que podrían superarse aplicando transgénesis, lo que requiere un protocolo eficiente de multiplicación y regeneración como la embriogénesis somática. Para inducir embriogénesis somática en *Musa* spp. el explante más usado son las manos de flores masculinas inmaduras, no obstante, el método convencional para su extracción implica dificultades prácticas. Recientemente se reportó para el cultivar Dwarf Brazilian (*Musa* AAB) una metodología más sencilla que la convencional para extraer explantes con flores masculinas, pero se desconoce si el manejo del material vegetal con este método causa problemas de oxidación. El objetivo de esta investigación fue evaluar la oxidación fenólica al inducir embriogénesis somática en explantes con flores masculinas inmaduras de Gran Enano, extraídos con el método convencional y con la metodología novedosa propuesta para Dwarf Brazilian. Se esterilizaron con alcohol isopropílico bellotas reducidas, se lavaron con agua y se redujeron nuevamente. Se extrajeron explantes de cada bellota con flores masculinas usando dos métodos: el convencional (aislando manos florales) y el método nuevo (seccionando la bellota). Los explantes se cultivaron durante 7-9 meses en medios semisólidos y en oscuridad, a 27±4°C. Se obtuvo un porcentaje bajo de explantes con oxidación intensa en las flores, tanto al usar el método convencional (7,35%) como la metodología

novedosa (0,25%). En general, la oxidación no afectó el establecimiento de los explantes y la extracción de los mismos resultó más sencilla al aplicar el método novedoso.

Palabras clave: embriogénesis somática, *Musa*, inducción, Gran Enano, oxidación.

Abstract

The bananas and plantains (*Musa* spp.) are economically important crops in the world. Their classical improvement has very limitations which could be overcome with transgenic plants. Plant transgenesis require an efficient method for multiplication and regeneration like somatic embryogenesis. For somatic embryogenesis induction the more used explant are immature male flowers; however the application of this method has practice difficulties for flower extractions. More recently was reported a more simple methodology applied in the cultivar Dwarf Brazilian (*Musa* AAB) to process the male immature flowers but is not described the oxidation problems that could be occurred for the application of this methodology. The objective of this research was to evaluate the phenolic oxidation during the somatic embryogenesis induction in explants with immature male flowers of Grand Nain using both methods for the explants extraction. Male buds were reduced and sterilized with isopropyl alcohol, washed with sterile water and reduced again. From each sterilized male bud were extracted immature male flowers with two methods: the conventional method (isolating floral hands) and the new method (separating the acorn). All the explants were cultured during 7 to 9 month in semisolid media, in dark at 27±4 °C. A low percentage of explants were obtained with intense oxidation in the flowers, so much when using the conventional method (7.35%) as the novel methodology (0.25%). In general, the oxidation didn't affect the establishment of the explants and the extraction of the same ones was simpler when applying the new method.

Key words: somatic embryogenesis, *Musa*, induction, Grand Nain, oxidation.

Introducción

Las bananas y los plátanos (*Musa* spp.) se encuentran entre las frutas con mayor importancia económica en el mundo (Jalil *et al.*, 2003). En nuestro país el cultivo de estas frutas, especialmente del banano Gran Enano (*Musa* AAA), proporciona parte insustituible de la dieta diaria del venezolano, aporta divisas y genera empleos (Delgado y Paiva, 2001).

Introduction

Bananas and plantains (*Musa* spp.) are placed between fruits with a higher importance in the world (Jalil *et al.*, 2003). In our country the cultivation of these fruit, especially of banana Grand Nain (*Musa* AAA), proportion no substitution part of the Venezuelan daily diet, gives exchanges and generate employments (Delgado and Paiva, 2001).

Las enfermedades fungales y virales representan la principal amenaza para la producción de bananos y plátanos (Houllou-Kido *et al.*, 2005). Su control se realiza asperjando intensamente con productos químicos, lo cual perjudica el ambiente y la salud humana e incrementa los costos de producción (Novak *et al.*, 1989). El mejoramiento genético convencional para conferir resistencia a patógenos a *Musa* spp. ha sido limitado hasta ahora (Khalil *et al.*, 2002), debido al escaso conocimiento sobre los mismos, la poliploidía y la baja fertilidad de las plantas (Sági *et al.*, 1994).

La propagación masiva de genotipos élite, la variación somaclonal y la transformación genética, pueden usarse para vencer algunos factores que limitan el mejoramiento genético convencional de bananos y plátanos; no obstante, estas aplicaciones requieren como base protocolos eficientes para la multiplicación y regeneración de plantas (Navarro *et al.*, 1997).

La utilidad de la embriogénesis somática en el mejoramiento genético de *Musa* spp. radica en que ésta es considerada el método de micropropagación de plantas más eficiente (Monsalve *et al.*, 2005). Además, el material embriogénico es adecuado para introducir genes, inducir mutaciones y realizar selección *in vitro* (Gómez *et al.*, 1999).

En Musáceas la embriogénesis somática se ha inducido usando ápices vegetativos (Cronauer y Krikorian, 1983), embriones cigóticos (Cronauer y Krikorian, 1988; Escalant y Teisson, 1989; Marroquin *et al.*, 1993), cormo y base de hojas

Fungal diseases and viral represents the principal menace for the production of bananas and plantains (Houllou-Kido *et al.*, 2005). Its control is made by sprinkling in an intense way by using chemical products, which damages the environment and human health increases the production costs (Novak *et al.*, 1989). The conventional genetic improvement for giving resistance to pathogen in front of *Musa* spp. have been limited until this moment (Khalil *et al.*, 2002), because the scarce knowledge about these, the polyploid and the low plant fertility (Sági *et al.*, 1994).

The massive propagation of elite genotypes, the seasonal variation and the genetic transformation, can be used for conquer several factors that limits the conventional genetic improvement of bananas and plantains; however, these applications requires like basement efficient protocols for the plants multiplying and regeneration (Navarro *et al.*, 1997).

The useful of somatic embryogenesis in the genetic improvement of *Musa* spp. is to be considered like the plants micro propagation method more efficient (Monsalve *et al.*, 2005). Also, embryogenic material is adequate for introducing genes, to induce mutations and to accomplish *in vitro* selection (Gomez *et al.*, 1999).

In Musaceas the somatic embryogenesis have been induced by using vegetative apex (Cronauer and Krikorian, 1983), zygotic embryo (Cronauer and Krikorian, 1988; Escalant and Teisson, 1989;

(Novak *et al.*, 1989), yemas adventicias (Dhed'a *et al.*, 1991), flores femeninas inmaduras (Grapin *et al.*, 2000) y flores masculinas inmaduras (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 1996; Jalil *et al.*, 2003; Ma, 1991). Éstas últimas han resultado ser el explante más adecuado para iniciar cultivos embriogénicos (Jalil *et al.*, 2003).

La extracción de explantes con flores masculinas para la inducción de la embriogénesis somática en *Musa* spp. ha consistido convencionalmente en aislar manos florales enteras (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 2000; Grapin *et al.*, 1996; Jalil *et al.*, 2003). Esto implica dificultad práctica, pues se requiere usar un estereoscopio, invertir mucho tiempo y tener gran destreza manual.

Recientemente, para inducir la embriogénesis somática del cultivar Dwarf Brazilian (*Musa* AAB), se utilizó un método en el que en lugar de aislar manos florales completas, se realizaron cortes longitudinales y transversales de las bellotas hasta obtener explantes con flores masculinas inmaduras y porciones de brácteas (Khalil *et al.*, 2002). Esta metodología de extracción de explantes novedosa resulta mucho más sencilla que la convencional; sin embargo, se desconoce si el manejo del material vegetal por este nuevo método afecta el establecimiento de los explantes, ya que estos podrían sufrir oxidaciones fenólicas fuertes debido a los numerosos cortes que deben realizarse para extraerlos. Tales oxidaciones podrían inhibir el crecimiento de los explantes y hacer que pierdan su viabilidad (Ramírez, 1998).

Marroquin *et al.*, 1993), corm and leaves base (Novak *et al.*, 1989), adventitious buds (Dhed'a *et al.*, 1991), immature female flowers (Grapin *et al.*, 2000) and immature male flowers (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 1996; Jalil *et al.*, 2003; Ma, 1991). These last ones have result the more adequate explant for beginning embryogenic crops (Jalil *et al.*, 2003).

The explants extraction with male flowers for the induction of the somatic embryogenesis in *Musa* spp. have consisted in a conventional way in isolating total flowers hands (Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 2000; Grapin *et al.*, 1996; Jalil *et al.*, 2003). This implies practical difficulty because the usage of a stereoscope is required, and also to invest a lot of time and having good manual ability.

Recently, for inducing the somatic embryogenesis of Dwarf Brazilian (*Musa* AAB) cultivar, a method different to isolating total floral hands was used; longitudinal and transversal cuttings of acorns until obtaining explants with immature male flowers and bracts portions (Khalil *et al.*, 2002). This novel extraction methodology result simpler than those conventional; however, it is unknown is the management of cultural management by this new method affects the explant establishment, since these could suffer strong phenolic oxidations due to numerous cuttings that have to be accomplish for extracting them. These oxidations could inhibit the explants growing and makes that they loose its viability (Ramírez, 1998).

The objective of this research

El objetivo de la presente investigación fue comparar la oxidación producida al inducir la embriogénesis somática en explantes con flores masculinas inmaduras de Gran Enano extraídos con el método convencional (Grabin *et al.*, 1996) y con la metodología novedosa propuesta para el cultivar Dwarf Brazilian (Khalil *et al.*, 2002).

Materiales y métodos

Recolección y esterilización del material vegetal

La recolección del material vegetal se realizó durante julio y agosto de 2005 en una plantación comercial de la empresa BANAORO, C.A., localizada en la finca Punta de Oro (km 14 de la vía a La Ceiba, Estado Trujillo).

El material vegetal se obtuvo de bellotas del cultivar Gran Enano recolectadas cuando se habían abierto de 7 a 12 brácteas después de la última flor femenina. Cada bellota se cortó 15 cm antes del ápice y se redujo a 3 cm de longitud en condiciones no estériles, mediante la remoción de las brácteas externas y de las manos cubiertas por éstas. Las bellotas reducidas se esterilizaron superficialmente sumergiéndolas en alcohol isopropílico 70% (v/v) durante 15 min. Inmediatamente, las bellotas estériles se lavaron tres veces con agua destilada en una cámara de flujo laminar horizontal. Las bellotas lavadas se mantuvieron en una solución antioxidante (cisteína: 60 mg.L⁻¹ + ácido ascórbico: 100 mg.L⁻¹) hasta la extracción de los explantes.

was to compare the oxidation produced when inducing the somatic embryogenesis in explants with immature male flowers of Grand Nain extracted by the conventional method (Grabin *et al.*, 1996) and with the novel methodology proposed for the cultivar Dwarf Brazilian (Khalil *et al.*, 2002).

Materials and methods

Recollection and sterilization of vegetal material

Recollection of vegetal material was made during July and August 2005 in one commercial plantation of the BANAORO, C.A. enterprise, located in Punta de Oro farm (km 14 of La Ceiba Trujillo state).

The vegetal material was obtained from acorn of Grand Nain cultivar collected when they had open from 7 to 12 bracts after the last female flower. Each acorn was cut 15 cm before the apex and it was reduced to 3 cm longitude in no sterile conditions, by the removal of external branches and of hands covered by them. Reduced acorns were superficially sterilized by immerse them into isopropyl alcohol to 70% (v/v) during 15 min. Immediately, the sterile acorns were washed three times with distilled water in a horizontal laminar flux chamber. The washed acorns were maintained in one anti oxidant solution (cysteine: 60 mg.L⁻¹ + ascorbic acid: 100 mg.L⁻¹) until the explant extraction.

Extraction and selection of explants

Method 1 (Grabin *et al.*, 1996):

Extracción y selección de explantes

Método 1 (Grapin *et al.*, 1996): se redujeron a 1 cm de longitud las bellotas lavadas, removiendo en condiciones estériles las brácteas y las manos florales mediante una pinza y un bisturí. Se aislaron las manos de las posiciones 1 a 16 de cada una de estas bellotas, utilizando un microscopio estereoscópico. Para ello se consideró que la posición 1 era ocupada por la mano más cercana al meristemo floral. Las manos aisladas se colocaron en una placa de Petri y se mantuvieron humedecidas con solución antioxidante hasta el momento de su siembra en el medio de cultivo. Se seleccionaron como explantes las manos en las posiciones 5 a 16 de 34 bellotas.

Método 2 (Khalil *et al.*, 2002): la reducción a 1 cm de longitud de las bellotas lavadas se hizo siguiendo el procedimiento descrito para el método anterior. Posteriormente se cortó longitudinalmente cada bellota a través del eje floral en cuatro segmentos más o menos iguales (figura 1A y 1B). A su vez, cada segmento se dividió transversalmente en cinco secciones: cuatro secciones de aproximadamente 1 mm de ancho (secciones 1, 2, 3 y 4) y una de 5 mm de ancho (sección 5). Esta última correspondió a la parte más apical de la bellota (figura 1C). Se seleccionaron como explantes las secciones 1-4 de 34 bellotas (16 explantes por bellota). Se mantuvo el material vegetal humedecido con solución antioxidante durante todo el proceso de extracción de los explantes.

Cultivo de los explantes

Método 1: se sembraron los explantes provenientes de 34 bellotas

The washed acorns were reduced to 1 cm length, by removing in sterile conditions the bracts and the floral hands by using a tong and a scalpel. Hands of positions 1 to 16 from each of acorns were isolated, by using a stereoscopic microscope. Therefore, it was considered that position 1 was occupied by the closer hand to the floral meristem. Hands isolated were placed in a Petri dish and they were maintained moisture by using an anti oxidant solution until the sowing time in the cultivation medium. Those hands in positions 5-16 of 34 acorns were considered like explants.

Method 2 (Khalil *et al.*, 2002): the reduction to 1 cm length of washed acorns was made by following the procedure described from the previous method. After, each acorn was cut in a longitudinal way through the floral axe in four segments more or less equal (figure 1A and 1B). At the same time, each segment was transversally divided into five sections: four sections of approximately 1 mm width (sections 1, 2, 3 and 4) and one of 5 mm width (section 5). The last one corresponded to the more apical part of acorn (figure 1C). Sections 1-4 of 34 acorns (16 explants by acorn) were selected like explants. The moisture vegetal material was maintained with anti oxidant solution during all the extraction process of explants.

Explants cultivation

Method 1: explants from 34 acorns (408 hands) were sowed in the semi solid medium conventionally used for the induction of the somatic embryogenesis (Grapin *et al.*, 1996). This was made 18 to 72 hours after collections of vegetal material. In each

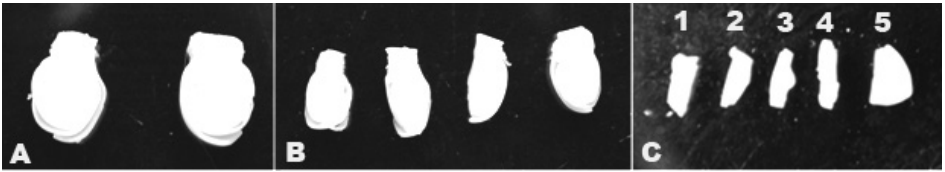


Figura 1. Extracción de explantes para la inducción de la embriogénesis somática en Gran Enano (*Musa AAA*): (A) Bellota cortada longitudinalmente a la mitad; (B) Bellota dividida longitudinalmente en cuatro segmentos; (C) Secciones obtenidas a partir de un segmento de la bellota: 1, 2, 3, 4 (secciones seleccionadas como explantes), 5 (sección descartada).

Figure 1. Explants extraction for the induction of the somatic embryogenesis in Gran Enano (*Musa AAA*): (A) Cut acorn in a longitudinal way to an a half; (B) Acorn divided in a longitudinal way in four segments; (C) Sections obtained from one segment of the acorn: 1, 2, 3, 4 (sections choose as explants), 5 (ruled out section).

(408 manos) en el medio semisólido usado convencionalmente para la inducción de la embriogénesis somática (Grapin *et al.*, 1996). Esto se hizo 18 a 72 horas después de las recolecciones del material vegetal. En cada recipiente se colocaron tres explantes de posiciones contiguas y se cultivaron por 7 a 9 meses.

Método 2: se sembró un total de 544 explantes (34 bellotas x 16 explantes) en el medio semisólido M1 para la inducción de la embriogénesis somática (Khalil *et al.*, 2002). Las siembras se hicieron 18 a 72 horas luego de las recolecciones del material vegetal. Se colocaron en un mismo recipiente de cultivo los cuatro explantes de cada bellota que correspondían a la misma sección (sección 1, 2, 3 ó 4). Siguiendo este orden de siembra, cuarenta días después, se transfirieron las flores a medio M1

recipient three explants of contiguous positions were placed and they were cultured during 7 to 9 months.

Method 2: A total of 544 explants (34 acorns x 16 explants) were sowed in the semi solid medium M1 for the induction of somatic embryogenesis (Khalil *et al.*, 2002). Sowings were made 18 to 72 hours after collections of vegetal material. The four explants of each acorn corresponding to the same section were put in the same cultivation recipient (section 1, 2, 3 or 4). By following this sowing order, forty days after, flowers were moved to a medium M1 fresh, maintaining separated the flowers of different explants. These flowers were kept in M1 during 7 to 9 months.

The compact white calluses produced from flowers transferred to a medium M1 fresh were cultivated during four months in the semi solid

fresco, manteniendo separadas las flores de explantes diferentes. Estas flores se mantuvieron en M1 por 7 a 9 meses.

Los callos blancos compactos producidos a partir de las flores transferidas a medio M1 fresco se cultivaron durante cuatro meses en el medio semisólido MM1 (Khalil *et al.*, 2002), colocando 1 a 5 callos en cada recipiente.

Los medios de cultivo utilizados se dispensaron en frascos de vidrio de 160 mL de capacidad, a razón de 25 mL por frasco. Los recipientes se taparon con papel de aluminio y Envoplast® y se mantuvieron en oscuridad a 27±4°C durante todo el cultivo.

Evaluación del grado de oxidación de los explantes

Se describió el grado de oxidación de los explantes a los 40 a 42 días de cultivo, usando escalas cualitativas basadas en la intensidad de la oxidación observada macroscópicamente en los explantes. Se utilizó una escala para las porciones de brácteas (figura 2A), una para la bases de las manos (figura 2B) y dos escalas para las flores (figura 3). En estas escalas el grado I correspondió a ausencia de oxidación u oxidación leve, el grado II a oxidación moderada y el grado III a oxidación intensa.

Todos los explantes sembrados fueron observados cada dos semanas durante 7 a 9 meses para determinar la formación de callos blancos, amarillos o embriogénicos.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos de frecuencias simples para los datos relacionados con el grado de

medium MM1 (Khalil *et al.*, 2002), by placing 1 to 5 calluses in each recipient.

Cultivation medium used were dispersed in glass flasks of 160 mL, at a reason of 25 ml by flask. Recipients were covered with aluminum paper and Envoplast® and they were kept in darkness to 27±4°C during all the cultivation.

Evaluation of the explants oxidation degree

The oxidation degree was described at 40 - 42 cultivation days, by using qualitative scales based on the intensity of the oxidation observed macroscopically in explants. One scale for the bracts position was used (figure 2A), one for hands bases (figure 2B) and two scales for flowers (figure 3). In these scales degree I corresponded to the light oxidation absence, degree II to moderate oxidation and degree III to the intense oxidation.

At the sowed explants were observed each two weeks during 7 to 9 months for determining the formation of white, yellow or embryogenic calluses.

Statistical analysis

Descriptive analyses of simple frequencies were made for data related to the oxidation degree of explant. Also, descriptive analysis of crossed frequencies for studying the association of distribution behaviors distribution between pairs of variables. For each oxidation degree (I, II or III), the oxidation presence variable was confronted to the hand position variable (method 1) or with the acorn segment section variable (method 2).

In all the analysis the *Statistical*

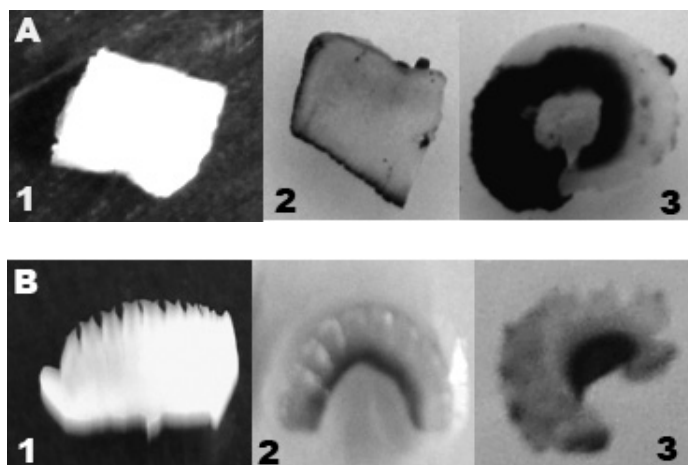


Figura 2. Grado de oxidación en explantes de Gran Enano (*Musa* AAA), durante la inducción de la embriogénesis somática: (A) Escala cualitativa usada para los bordes de las porciones de brácteas; (B) Escala cualitativa empleada para las bases de las manos de flores. A1, B1: oxidación leve o ausencia de oxidación (grado I); A2, B2: oxidación moderada (grado II), A3, B3: oxidación intensa (grado III).

Figure 2. Oxidation degree in explants of Grand Enano (*Musa* AAA), during the induction of the somatic embryogenesis: (A) Qualitative scale used for the edges of portions of bracts; (B) Qualitative scale used for bases of flower hands. A1, B1: light oxidation or oxidation absence (degree I); A2, B2: moderate oxidation (degree II), A3, B3: intense oxidation (degree III).

oxidación del explante. Además, se hicieron análisis descriptivos de frecuencias cruzadas para estudiar la asociación de comportamientos de la distribución de frecuencias entre pares de variables. Se confrontó, para cada grado de oxidación (I, II o III), la variable presencia de oxidación con la variable posición de la mano (método 1) o con la variable sección del segmento de la bellota (método 2).

En todos los análisis se usó el programa de computación *Statistical*

Analysis System (SAS) 8.01, 2000, was used.

Results and discussion

A size increase in all the cultivated explants (methods 1 and 2) was observed. Thos also was registered two or three weeks after beginning cultivation of immature male flowers for inducing somatic embryogenesis in Grand Nain cultivars (Cronauer and Krikorian,

Analysis System (SAS), release 8.01, año 2000.

Resultados y discusión

Se observó aumento de tamaño en todos los explantes cultivados (métodos 1 y 2). Esto también fue registrado dos o tres semanas después de iniciar el cultivo de flores masculinas inmaduras para inducir la embriogénesis somática en los cultivares Gran Enano (Cronauer y Krikorian, 1983), Mas (*Musa AA*) (Ilker *et al.*, 2007) y Dwarf Brazilian (Khalil *et al.*, 2002).

A los 40 días de cultivo, las porciones de brácteas del 100% de los explantes sembrados según el método 2, presentaron oxidación fenólica de grado II o III en los bordes y de grado I en el resto de la porción (figura 2A). De modo similar, al aplicar el primer método, se observó que el 100% de los explantes presentó oxidación fenólica de grado III en la base a los 42 días de cultivo (figura 2B). Resultados similares fueron obtenidos al sembrar manos de flores masculinas inmaduras del cultivar Mas en un medio semisólido para la inducción de la embriogénesis somática (Cronauer y Krikorian, 1988).

Cuarenta días después del inicio del ensayo se observó que de los explantes sembrados de acuerdo al método 2, el 27,39% carecía de flores y estaba conformado sólo por brácteas, debido a que tales explantes correspondían a la parte apical de las bellotas. Estos explantes se descartaron, considerándose para la descripción del grado de oxidación de las flores el 72,61% restante (395 explantes). De

1983), Mas (*Musa AA*) (Ilker *et al.*, 2007) and Dwarf Brazilian (Khalil *et al.*, 2002).

At 40 days of cultivation, bracts portions of 100% of sowed explants according to method 2, showed phenolic oxidation degree II or III in edges and degree I in the rest of portion (figure 2A). In a similar way, when applying the first method, it was observed that 100% of explants showed phenolic oxidation of degree III in the base at 42 days of cultivation (figure 2B). Similar results were obtained when immature male flowers hands of Mas cultivar were sowed in a semi solid medium for the induction of somatic embryogenesis induction (Cronauer and Krikorian, 1988).

Forty days after beginning of essay, from sowed explants according to method 2, it was observed that 27.39% did not have flowers and it was formed only by bracts, because these explants corresponded to the apical part of acorns. These explants were ruled out, by being considered for the description of oxidation degree of flowers, the remaining 72.61% (395 explants). From these explants, at the end of culture the 90.63% showed in flowers a light oxidation or absence of oxidation (degree I), 9.12% showed moderate oxidation (degree II) and only the 0.25% showed intensely oxidized flowers (degree III) (figure 3A).

With method 1, at 42 days of cultivation, the following results were obtained: flowers of 92.83% of explants showed light oxidation or not showed oxidation, the moderate oxidation of flowers occurred in the

estos explantes, al final del cultivo el 90,63% presentó en las flores una oxidación leve o ausencia de oxidación (grado I), 9,12% tuvo oxidación moderada (grado II) y sólo el 0,25% mostró flores oxidadas intensamente (grado III) (figura 3A).

Con el método 1, a los 42 días de cultivo se obtuvieron los resultados siguientes: las flores del 92,83% de los explantes tuvieron oxidación leve o no estaban oxidadas, la oxidación moderada de las flores ocurrió en el 1,65% de las manos y el porcentaje de explantes con flores oxidadas intensamente fue 7,35% (figura 3B).

El bajo porcentaje de explantes con oxidación intensa en las flores registrado al usar los métodos 1 y 2 es un resultado positivo, ya que las oxidaciones fenólicas pueden constituir un serio problema en el establecimiento de explantes *in vitro* (Laukkanen *et al.*, 1999).

La oxidación fenólica provoca un fenómeno de ennegrecimiento que ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas (Ramírez, 1998), como por ejemplo, las heridas que se ocasionan al realizar cortes para extraer los explantes (Anderson y Ievinsh, 2002). Estas enzimas, contenidas en el citoplasma y las vacuolas (Laukkanen *et al.*, 1999), actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse y afectar a las proteínas, y en consecuencia, inhibir el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Ramírez, 1998).

En este sentido, es importante

1.65% of hands and the explants percentage with intensely oxidized flowers 7.35% (figure 3B).

The little percentage of explants with intense oxidation in flowers registered when using methods 1 and 2 is a positive result, because the phenolic oxidations could constitute a serious problem in the *in vitro* explants establishment (Laukkanen *et al.*, 1999).

Phenolic oxidation provokes darkness phenomenon that occurs by the enzymes action of polyphenoloxidasas and tyrosinase that are released or synthesized when tissues are injured (Ramírez, 1998), like for example, injuries produced when cuts are made for extracting explants (Anderson and Levinsh, 2002). These enzymes contained in cytoplasm and vacuoles (Laukkanen *et al.*, 1999), acts on the polyphenols and tyrosine, oxidizing them to quinones that becomes phytotoxic, substances that could be polymerized and to affect proteins, and as a consequence, inhibit explants growth and viability (Ramírez, 1998).

In this sense, it is important to detach that although in this research all the explants had oxidation degree III in the base (method 1), they were viable, and because its flowers continue the growing after this oxidation occurred. The moderate or intense oxidation in the bracts edges (method 2) did not affect the explants viability.

Results obtained in relation to the oxidation degree III in flowers when using methods 1 and 2, probably were caused by the maintenance in anti oxidant solution of reduced

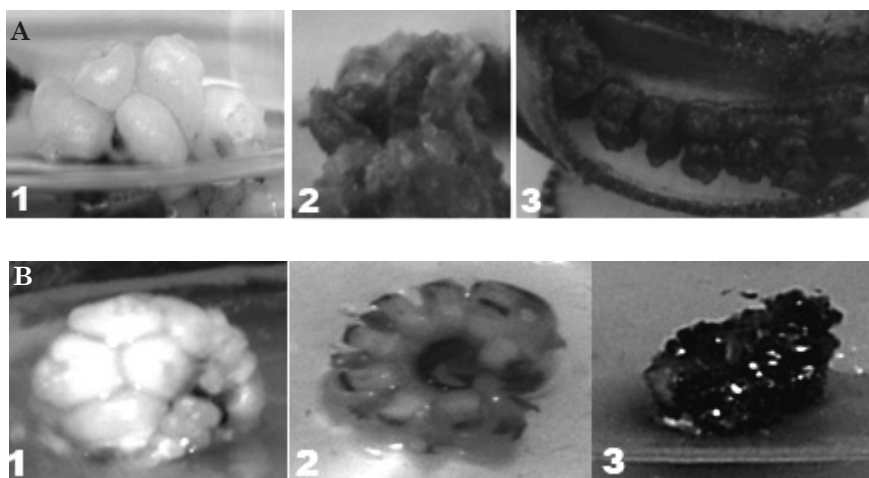


Figura 3. Grado de oxidación al inducir la embriogénesis somática en flores masculinas inmaduras de Gran Enano (*Musa AAA*): (A) Escala cualitativa utilizada para explantes extraídos por el método de Khalil *et al.* (2002); (B) Escala cualitativa usada para explantes extraídos según el método de Grapin *et al.* (1996). A1, B1: oxidación leve o ausencia de oxidación (grado I); A2, B2: oxidación moderada (grado II), A3, B3: oxidación intensa (grado III).

Figure 3. Oxidation degree when inducing the somatic embryogenesis in immature male flowers of Grand Enano (*Musa AAA*): (A) Qualitative scale used for extracted explants by Khalil *et al.* (2002); (B) Qualitative scale used for extracted explants according Grapin *et al.* (1996) method. A1, B1: light oxidation or oxidation absence (degree I); A2, B2: moderate oxidation (degree II), A3, B3: intense oxidation (degree III).

destacar que aunque en el presente estudio todos los explantes tuvieron oxidación de grado III en la base (método 1), los mismos fueron viables, pues sus flores continuaron creciendo luego de producirse esta oxidación. La oxidación moderada o intensa en los bordes de las brácteas (método 2) tampoco afectó la viabilidad de los explantes.

Los resultados obtenidos en relación a la oxidación de grado III en

acorns and by the moisturizing of vegetal material with this solution during the explant extraction. Also, it is possible that the explant cultivation in darkness would avoid a high oxidation (Jimenez, 1998).

As observed in figure 4A, the oxidation of degree II in flowers was obtained for hands of positions 5, 9, 11, 12, 13, 15 and 16. The higher explants percentage with this oxidation degree (0.74%) correspon-

las flores al usar los métodos 1 y 2, probablemente fueron debido al mantenimiento en solución antioxidante de las bellotas reducidas y al humedecimiento del material vegetal con esta solución durante la extracción de los explantes. También es posible que el cultivo de los explantes en oscuridad evitara una mayor oxidación (Jiménez, 1998).

Como se observa en la figura 4A, la oxidación de grado II en las flores se obtuvo para manos de las posiciones 5, 9, 11, 12, 13, 15 y 16. El mayor porcentaje de explantes con este grado de oxidación (0,74%) correspondió a la posición 5 (manos pequeñas: >0,5 mm), mientras que para el resto de las posiciones, es decir, para manos medianas (0,5-2 mm) y grandes (<2 mm) el porcentaje registrado fue 0,25%.

Con el método 2 la oxidación moderada de las flores ocurrió en explantes de las secciones 1, 2 y 3. El mayor porcentaje de explantes con este grado de oxidación se presentó para la sección 1 (2,94%), donde se encontraban las flores más grandes. En general, se observó que el porcentaje de explantes con oxidación moderada en las flores tendió a disminuir conforme aumentaba el número de la sección, es decir, conforme disminuía el tamaño de las flores.

Al aplicar el método 1 la oxidación de grado III en las flores se presentó en manos de las posiciones 5 a 14, obteniéndose el porcentaje más alto para la posición 6 (1,72%) y el más bajo para la posición 14 (0,25%) (figura 4B). El porcentaje de explantes con oxidación intensa en las flores fue mayor para las manos de menor ta-

ded to the position 5 (little hands: >0.5 mm), whereas for the rest of positions, it means, for medium hands (0.5 to 2 mm) and big ones (<2 mm) the registered percentage was 0.25%.

With the method 2 the moderate oxidation of flowers occurred in explants of sections 1, 2 and 3. The higher explant with this oxidation degree was showed for the section 1 (2.94%), where bigger flowers were in. In general, the explant percentage with moderate oxidation in flowers showed a tendency to diminish when the section number increased, it means, when the flowers size decreased.

When applying method 1 the oxidation of degree III in flowers was observed in hands of positions 5 to 14, by being got the higher percentage for the position 6 (1.72%) and the lower one for the position 14 (0.25%) (figure 4B). The explants percentage with intense oxidation in flowers was higher for the hands with little size (positions 5 to 7). It has been reported that the immature male flowers hands of *Musa* with a size inferior to 0.5 mm shows tissue death during the induction of somatic embryogenesis whereas in high hands continues its growing (Grapin *et al.*, 1998; Grapin *et al.*, 2000).

With method 2 the oxidation of degree III in flowers only was observed in one explant, corresponding to section 1 of the acorn segment.

The oxidation presence in bases or in hands flowers when inducing of somatic embryogenesis in *Musa* has been mentioned in some researches (Cronauer and Krikorian, 1988;

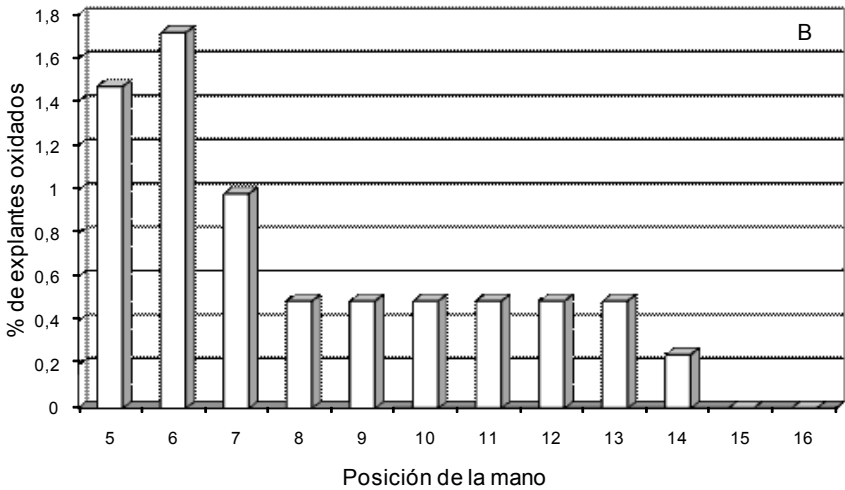
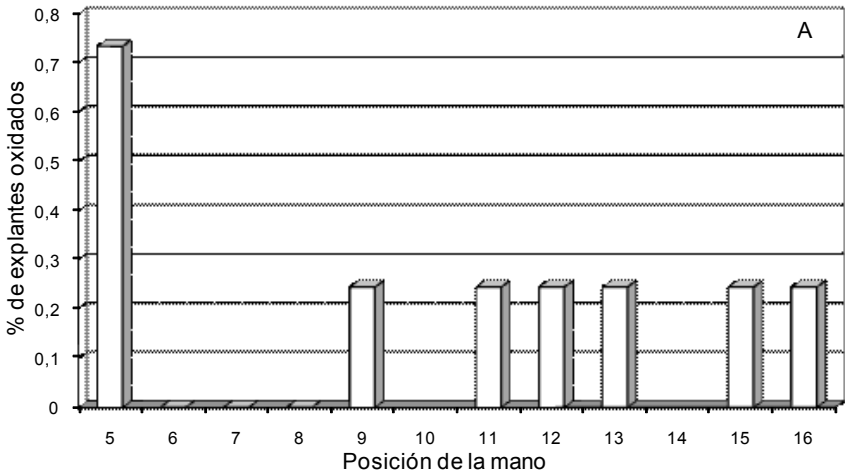


Figura 4. Distribución porcentual, según la posición, de las manos de flores masculinas inmaduras de Gran Enano (*Musa AAA*) que presentaron oxidación de las flores durante la inducción de la embriogénesis somática: (A) Oxidación moderada (grado II); (B) Oxidación intensa (grado III).

Figure 4. Percentual distribution, according to the position, of immature male flowers hands of Grand Nain (*Musa AAA*) that showed flowers oxidation during the somatic embryogenesis induction: (A) Moderate oxidation (degree II); (B) Intense oxidation (degree III).

maño (posiciones 5 a 7). Se ha reportado que las manos de flores masculinas inmaduras de *Musa* con un tamaño inferior a 0,5 mm se necrosan durante la inducción de la embriogénesis somática, mientras que las manos grandes continúan creciendo (Grapin *et al.*, 1998; Grapin *et al.*, 2000).

Con el método 2 la oxidación de grado III en las flores se presentó sólo en un explante, correspondiente a la sección 1 del segmento de la bellota.

La presencia de oxidación en las bases o en las flores de las manos al inducir embriogénesis somática en *Musa* se ha mencionado en algunos trabajos (Cronauer y Krikorian, 1988; Grapin *et al.*, 1998; Grapin *et al.*, 2000). Sin embargo, en el presente estudio se detalla tanto para el método 1 como para el 2, el porcentaje de explantes que se oxidaron durante la inducción de la embriogénesis somática y la relación del grado de oxidación con la posición de la mano o el tamaño de las flores.

Durante la inducción del estado embriogénico, la presencia de auxinas puede estimular divisiones mitóticas que dan lugar a callos (Gómez, 1998). Se ha reportado que al utilizarse manos de flores masculinas inmaduras de *Musa* spp. para inducir la embriogénesis somática, los callos embriogénicos se forman sobre callos compactos nodulares amarillos (Grapin *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 1997; Novak *et al.*, 1989). Al aplicar el método 1, se registró este último tipo de callos en el 46,07% de los explantes; sin embargo, ninguna mano dio origen a embriones. Los callos nodulares amarillos se observaron a partir de las 10 semanas de cultivo, correspondiendo 1,23% a

Grapin *et al.*, 1998; Grapin *et al.*, 2000). However, in this paper is detailed for the method 1 and for method 2, the oxidized explant percentage during the induction of somatic embryogenesis and relationship of the oxidation degree with the hand position with the hand position or flowers size.

During the induction of embryogenic status, presence of auxin could stimulate mitotic divisions causing calluses (Gomez, 1998). It has been reported that when using immature male flowers hands of *Musa* spp. for inducing somatic embryogenesis, embryogenic calluses are formed on yellow nodule compact calluses (Grapin *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 1997; Novak *et al.*, 1989). When applying method 1, this last type of callus was registered in the 46.07% of explants; however, any hand gave origin to embryos. Yellow nodular calluses were observed from 10 weeks of cultivation, corresponding to 1.23% to explants with moderate oxidation in flowers, 0.25% to hands with intensely oxidize flowers and the rest to explants with oxidation of degree I in flowers. It is probable that acorn recollection in a dry time have not favored the embryos formation.

In this research, 3.49% of sowed explants initially with method 2 showed compact white calluses, corresponding to 2.94% and 0.55%, respectively, to explant with oxidation degree I or II in flowers. The formation of white calluses took place from 4 weeks of cultivation and any of them formed embryos. On the contrary, Khalil *et al.* (2002) said that when using the same method for the

explantos con oxidación moderada en las flores, 0,25% a manos con flores oxidadas intensamente y el resto a explantes con oxidación de grado I en las flores. Es probable que la recolección de las bellotas en una época seca haya desfavorecido la formación de embriones.

En esta investigación, 3,49% de los explantes sembrados inicialmente con el método 2 presentaron callos blancos compactos, correspondiendo el 2,94% y el 0,55%, respectivamente, a explantes con oxidación de grado I o II en las flores. La formación de callos blancos tuvo lugar a partir de las 4 semanas de cultivo y ninguno de estos callos formó embriones. En contraposición, Khalil *et al.* (2002) señalaron que al usar el mismo método para el cultivar Dwarf Brazilian, el 58,75% de los explantes produjo tejidos embriogénicos. Estos autores refirieron que debían realizarse experimentos adicionales para determinar si el alto porcentaje de callos embriogénicos obtenido se debía al cultivar (*Musa* AAB) o a efectos estacionales.

Con el método 2, los callos compactos amarillos se formaron en el 11,21% de los explantes iniciales, comenzándose a observar después de doce semanas de cultivo. El 0,2% de estos callos se originó de explantes con flores oxidadas moderadamente y el resto, de explantes con oxidación de grado I en las flores. Los callos embriogénicos se presentaron en el 0,92% de los explantes sembrados inicialmente, formándose sólo sobre callos amarillos provenientes de explantes con oxidación de grado I en las flores.

Dwarf Brazilian cultivar, 58.75% of explants produced embryogenic tissues. These authors pointed out that additional experiment will be carried out for determining if the high percentage of embryogenic calluses obtained was caused by the cultivar (*Musa* AAB) or to station effects.

With method 2, yellow compact calluses were formed in 11.21% of initial explants, by beginning to be observed after twelve weeks of cultivation. The 0.2% of these calluses was originated from explants with moderately oxidize flowers and the rest, from explants with oxidation degree I in flowers. Embryogenic calluses were present in the 0.92% of explants initially sowed, by being formed on yellow calluses from explants with oxidation degree I in flowers.

The results of this research have high relevance, because method 2, proposed for the explants extraction with immature male flowers of plantain Dwarf Brazilian, have not been reported for Grand Nain nor for any other *Musa* cultivars. Besides, this research is the first one that offers all the details for achieving the successful extraction of explants by following the referred method.

Conclusions

The intense phenolic oxidation in hands bases or in the bracts edges did not affect the viability of flowers. Explants oxidation extracted by methods 1 and 2 did not represent a problem for its *in vitro* establishment.

Los resultados del presente ensayo son de gran relevancia, pues el método 2, propuesto para la extracción de explantes con flores masculinas inmaduras del plátano Dwarf Brazilian, no ha sido reportado para Gran Enano ni para otros cultivares de *Musa*. Además, este trabajo es el primero en el que se ofrecen todos los detalles para lograr la extracción exitosa de explantes siguiendo tal método.

Conclusiones

La intensa oxidación fenólica en las bases de las manos o en los bordes de las brácteas no afectó la viabilidad de las flores. La oxidación de los explantes extraídos por los métodos 1 y 2 no representó un problema para su establecimiento *in vitro*.

Agradecimiento

Se agradece al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por financiar esta investigación (Proyecto CC-0065-04) y a BANAORO, C.A. por suministrar el material vegetal.

Literatura citada

- Anderson, U. y G. Ievinsh. 2002. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. *Annals of Botany* 90:293-298.
- Cronauer, S. y A. Krikorian. 1983. Somatic embryos from cultured tissue of triploid plantains (*Musa* ABB). *Plant Cell Rep.* 2:289-291.
- Cronauer, S. y A. Krikorian. 1988. Plant regeneration via somatic

Acknowledgement

Authors want to express their thanks to the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) by financing this research (Project CC-0065-04) and to BANAORO, C.A. by supplying the vegetal material.

End of english version

embryogenesis in the seeded diploid *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Rep.* 7:23-25.

- Delgado, E. y R. Paiva. 2001. Estudio del efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) sobre la sostenibilidad de la producción de musáceas en Barinas, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 18:277-289.
- 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. y C. Teisson. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Rep.* 7:665-668.
- Escalant, J., 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.
- Gómez, R. 1998. Embriogénesis somática. p. 55-79. EN: Pérez, J., Y. Alvarado, R. Gómez, E. Jiménez, P. Orellana (Eds.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Ediciones GEO. Villa Clara, Cuba.

- Gómez, R., J. Escalant, M. Reyes, L. Osada y M. Freire. 1999. Embriogénesis somática en medio líquido en el cv 'Gran Enano' (*Musa* AAA). *Corbana* 25:143-154.
- Grapin, A., J. Ortiz, J. Domergue, J. Babeau, S. Monmerson, J. Escalant, C. Teisson y F. Côte. 1998. Obtención de callos embriogénicos, iniciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas a partir de flores inmaduras masculinas y femeninas de *Musa*. *InfoMusa* 7:13-15.
- Grapin, A., J. Ortiz, T. Lescot, N. Ferrière y F. Côte. 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 61:237-244.
- Grapin, A., J. Schwendiman y C. Teisson. 1996. Somatic embryogenesis in plantain banana. *In vitro Cell Dev. Biol.* 32:66-71.
- Houllou-Kido, L., E. Kido, M. Falco, M. Filho, A. Figueira, L. Nogueira, M. Rossi y A. Neto. 2005. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana 'Maçã' regeneration. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (BRA), 40:1081-1086.
- Ilker I., M. Vezir y O. Ercan. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 6:003-008.
- Jalil, M., N. Khalid y R. Othman. 2003. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 75:209-214.
- Jiménez, E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. p. 55-79. EN: Pérez, J., Y. Alvarado, R. Gómez, E. Jiménez, P. Orellana (Eds.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Ediciones GEO. Villa Clara, Cuba.
- Khalil, S., K. Cheah, E. Perez, D. Gaskill y J. Hu. 2002. Regeneration of banana (*Musa* spp. ABB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 20:1128-1134.
- Laukkanen, H., H. Häggman, S. Kontunen-Soppela, A. Hohtola. 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologica Plantarum* 106: 337-343.
- Ma, S. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. p. 181-188. En: National Taiwan University (Eds). *Proc Symp Tissue Cult Horticult Crops* Department of Agriculture. Taipei, Taiwan.
- Marroquin, C., C. Paduscheck, J. Escalant y C. Teisson. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29:43-46.
- Monsalve, L., C. García, A. Sigarrosa. 2005. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el Departamento norte de Santander, Colombia. *Revista Respuestas*, Universidad Francisco de Paula Santander Año 10, 1:21-29.
- Navarro, C., R. Escobedo y A. Mayo. 1997. *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 51:17-25.
- Novak, F., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B. Conger y T. Xiolang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (AAB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Tech.* 46:125-135.
- Ramírez, M. 1998. Tratamientos a plantas madres y al explante para el establecimiento *in vitro* del

guayabo (*Psidium guajava* L.). Trabajo de Grado. Maracaibo. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. División de Estudios para Graduados. Programa Fruticultura. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. 132 p.

Sági, L., S. Remy, B. Panis, R. Swennen y G. Volckaert. 1994. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. 'Bluggoe', ABB group) protoplast isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. *Plant cell Rep.* 13:262-266