

Biblioteca Conmemorativa
ORTON - IICA - CATIE
7 ENE 2002
RECIBIDO
Turrialba - Costa Rica

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CATIE

Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación
Escuela de Posgrado

**Desarrollo de una metodología para la transformación genética de
banano (cv Gran Enano) y plátano (cv Curraré) de consumo local
para introducir resistencia a la Sigatoka negra
(*Mycosphaerella fijiensis*)**

**Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado,
Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del
Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza y como
requisito parcial para optar por el grado de:**

Magister Scientiae

Por
Juan Luis [✓]Órtiz Vargas

Turrialba, Costa Rica

2001

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

María Elena Aguilar, Ph.D.
Consejero Principal

Miguel Gómez Lim, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

Marta Valdéz, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

Jorge Sandoval, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

Nelly Vásquez, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Ali Moslemi, Ph.D.
Director Escuela de Posgrado

Juan Luis Ortiz Vargas
Candidato

**A mi esposa Ingrid Roxana
A mis hijos José Roberto y Katherine María,
por toda su comprensión y
apoyo para seguir adelante.**

A mi padre, a mis hermanas y hermano.

**Y a la memoria de mi madre,
que siempre me brindó su apoyo y me guió
para que siguiera adelante.**

Agradecimientos

A la Dra María Elena Aguilar, profesora consejera y jefa de la Unidad de Biotecnología del CATIE, por su esfuerzo, ayuda, amistad y confianza en mi persona, ya que sin su deseo de colaboración desinteresada, este trabajo no se hubiera podido realizar.

A Nelly Vásquez, por su amistad, respeto y deseos de colaboración en todo momento y por ser miembro de mi comité.

Al Dr. Miguel Gómez (CINVESTAV, Irapuato, México) por toda la colaboración brindada durante mi estadía en su laboratorio y por su apoyo a la distancia durante el transcurso de la investigación.

Al Dr Jorge Sandoval, por brindarme su amistad y apoyo durante muchos años y por su colaboración como miembro del comité asesor.

A la Dra Marta Valdéz de la Universidad de Costa Rica, por ser miembro de mi comité asesor.

A Emilio Mora por su amistad y por motivarme a continuar mis estudios en la Escuela de Posgrado del CATIE.

Al CATIE y a la Escuela de Posgraduados por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, y a todas aquellas personas que colaboraron durante estos dos años.

A todos mis compañeros de la Unidad de Biotecnología del CATIE, por su amistad y por brindarme su apoyo cuando lo solicité, a Guillermo Hidalgo por su asesoría en todo lo relacionado a computación y fotografía y a todas aquellas personas que en su momento me brindaron su amistad y apoyaron mis deseos de superación.

Al personal del Laboratorio de Ingeniería Genética del CINVESTAV, por aceptarme y por brindarme su amistad, especialmente a Toño por compartir sus conocimientos y por sus muestras de amistad, de igual manera a Lupita y Abel.

A mis compañeros de maestría (Juan Jiménez, Julian, Jeannete, Nadia, Alex, Adalberto, Fredy y Luis) por su amistad.

A mi fuente de financiamiento ASDI.

CONTENIDO

RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	xi
I. INTRODUCCION	1
1. Objetivos	4
1.1.- Objetivo general	4
1.2.- Objetivos específicos	4
2. Hipótesis	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Posición taxonómica y clasificación de las Musáceas	5
2.2. Botánica del género <i>Musa</i>	6
2.3. Distribución e importancia	6
2.4. Plagas y Enfermedades de las musáceas	7
2.4.1. Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>)	9
2.4.2. Mecanismos de defensa a hongos (Glucanasas y Quitinasas)	10
2.5. La biotecnología como herramienta al mejoramiento de <i>Musa</i>	11
2.5.1 Embriogenesis somática y suspensiones celulares embriogénicas	12
2.5.2. Transformación genética	14
2.5.3. Bombardeo de partículas (biobalística)	16
2.5.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
2.5.5. Importancia y uso de los cultivos embriogénicos y las técnicas de transformación genética en la lucha para la resistencia a Sigatoka negra	18
III.- MATERIALES Y METODOS	20
3.1. Localización del estudio	20
3.2. Materiales	20
3.2.1. Material vegetal	20
3.2.2. Vectores de transformación	20
3.2.3. Pistola para bombardeo de partículas	23
3.3. Métodos	23
3.3.1. Preparación de las suspensiones celulares	23
3.3.2. Preparación de plásmidos	24
3.3.3. Preparación de microproyectiles	24
3.3.4. Condiciones de bombardeo	24
3.3.5. Recuperación y regeneración de suspensiones celulares transformadas	25
3.3.6. Análisis de la expresión transitoria <i>uidA</i> β -glucuronidasa (GUS)	25
3.3.7. Análisis de la expresión estable utilizando resistencia a antibióticos	26
3.3.8. Análisis histológico	26
3.3.9. Variables a estudiar	27
3.4. Recolección de datos	27
3.4.1. Diseño experimental	27

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Factores que influyen en la eficiencia del bombardeo.....	29
4.1.1. Calidad de las suspensiones celulares.....	29
4.1.2. Tipo de microproyectil (oro y tungsteno)	33
4.1.3. Vectores de transformación.....	34
4.1.4. Presión y distancia durante el bombardeo	35
4.1.5. Determinación de la expresión transitoria	36
4.1.6. Sensibilidad de las suspensiones celulares o los agentes selectivos higromicina y kanamicina	38
4.1.6.1. Selección con higromicina (pHAGG)	38
4.1.6.2. Selección con kanamicina (pBI121).....	41
4.1.7. Germinación y desarrollo de embriones somáticos regenerados en medio con selección.....	42
V. CONCLUSIONES	45
VI. RECOMENDACIONES	46
VII. LITERATURA CITADA	47
VIII. ANEXOS.....	55

Ortiz, JL. 2001. Desarrollo de una metodología para la transformación genética de banano (*cv Gran Enano*) y plátano (*cv Curraré*) de consumo local para introducir resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*)

Palabras claves: *Musa spp*, Sigatoka negra, poliploidía, biotecnología, transformación genética, suspensiones celulares, bombardeo de partículas, Curraré, vectores de transformación, histológico, plásmido, GUS, kanamicina (*nptII*), higromicina (*hph*), glucanasas, quitinasas, promotor constitutivo, microproyectil, X-Gluc.

RESUMEN

Los bananos y plátanos (*Musa spp*), ocupan el cuarto lugar en producción a nivel mundial, lo que lo convierte en uno de los cultivos más importantes para los países en desarrollo. Sin embargo estos cultivos son seriamente amenazados por muchos problemas fitosanitarios, donde la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) es el principal problema, causando pérdidas entre un 30 y 50%.

A nivel mundial el mejoramiento genético convencional se ha visto limitado debido a que son especies que presentan esterilidad, poliploidía y se propagan vegetativamente.

La biotecnología ofrece las herramientas necesarias para superar esas barreras biológicas; una de esas herramientas es la transformación genética de cultivos celulares embriogénicos mediante el bombardeo de partículas cubiertas de ADN. Con este trabajo se logró establecer la calidad de las suspensiones celulares midiendo la capacidad de crecimiento en un período de 8 días, observaciones al microscopio y análisis histológico, evidenciaron una mejor calidad para el cultivar Curraré.

Para establecer las condiciones de bombardeo se evaluó dos vectores de transformación genética, el pBI121 que expresa el gen reportero GUS y el gen marcador *nptII* con resistencia a kanamicina, el segundo plásmido que se probó fue el pHAGG, que presenta en su construcción el gen reportero GUS, el gen marcador *hph*, que le confiere resistencia al antibiótico higromicina y además presenta los genes de glucanasas y quitinasas de interés agronómico que degradan las paredes del hongo constituido principalmente por quitinas y glucanos. Ambos vectores de transformación se encuentran bajo el dominio del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

La expresión transitoria se evaluó por medio del conteo de puntos azules 24 horas después del bombardeo; se evidenció mejores resultados para el cultivar Curraré a una distancia de 6 cm y con el microproyectil tungsteno, logrando obtener en promedio 2207 puntos azules para el mejor tratamiento.

El material se sometió a selección con el medio de regeneración M3. Para cultivos celulares bombardeados con el vector pBI121 se utilizó el antibiótico kanamicina a una concentración de 100 mg/l y para el vector pHAGG el antibiótico a una concentración de 75 mg/l, después de 2 meses en selección. Se observó la regeneración de agregados celulares embriogénicos con formación de embriones en diferentes estados de desarrollo. En esta etapa se llevó a cabo un análisis histoquímico que reveló la presencia del gen GUS en los agregados celulares; el análisis histológico mostró la integración uniforme del agente revelador X-Gluc en el interior del tejido.

Los embriones somáticos regenerados se subcultivaron al medio M4, logrando la germinación de 12 embriones. Secciones de tejidos de hoja y raíz se sometieron al agente revelador X-Gluc, observándose una tinción uniforme del tejido expuesto.

Finalmente los embriones germinados fueron subcultivados a medio de desarrollo M5 con el agente selectivo a higromicina y después de 1 mes en este medio continúan en crecimiento, expresando la resistencia al antibiótico.

Ortiz, JL. 2001. Development of a methodology for the genetic transformation of banana (cv Gran Enano) and plantain (cv Curraré) of local consumption to introduce resistance to black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*).

Palabras claves: *Musa* spp, black Sigatoka, poliploidy, biotecnology, genetic transformation, cellular suspension, particle bombardment, Curraré, transformation vectors, histological analysis, plasmid, GUS, kanamycin (*nptII*), higromycin (*hph*), chitinase, glucanase, promoter constitutive, microprojectile, X-Gluc, tungsten.

SUMMARY

Banana and plantain (*Musa spp*), occupy the fourth place in production at world-wide level, which turns them into one of the most important cultures for developing countries. Nevertheless, these cultures are seriously threatened by many phytosanitary problems, among which black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) is the most important, causing losses between 30 and 50%.

At world-wide level, conventional genetic improvement has been limited because there are species that present sterility, poliploidy and vegetative propagation. Biotechnology offers the necessary tools to surpass these biological barriers. One of these tools is the genetic transformation of embryogenic cellular cultures through particle bombardment covered with ADN. Through this study it was possible to establish suspensions quality by measuring its growth capacity in a period of 8 days. Microscope observations and histological analysis, demonstrated a better quality for Curraré cultivar.

In order to establish bombardment conditions, two genetic transformation vectors were evaluated: the pBI121 that expresses the gene reporter GUS and the marker gene *nptII* with resistance to kanamycin. Second plasmid proven was the pHAGG, that presents in its construction the GUS reporter gene, the marker gene *hph*, that confers resistance to the higromycin antibiotic and in addition, it displays the glucanase and chitinase genes of agronomic interest which mainly degrade the fungus walls constituted by chitinas and glucans. Both transformation vectors are under the dominion of the constituent promoter 35S, the cauliflower mosaic virus (CaMV).

The transient expression evaluated by counting blue dots 24 hours after the bombardment, demonstrated better results for Curraré cultivar at a distance of 6 cm and with the tungsten microprojectile, obtaining in average 2207 blue dots for the best treatment.

The material was subjected to using the selection M3 regeneration medium, for cellular cultures bombarded with vector pBI121 the kanamicina antibiotic was used at a concentration of 100/l and for the pHAGG vector was used higromycin antibiotic at a concentration of 75 mg/l, after 2 months under selection. Regeneration of embriogenic cellular aggregates with embryos formation at different development stages was observed. In this stage, a histochemical analysis was carried out that revealed the presence of the GUS gene in cellular aggregates; the histological analysis showed a uniform integration of the revealing X-Gluc agent into the tissue.

Regenerated somatic embryos were subcultivated into the M4 medium, obtaining germination of 12 embryos. Leaf tissue and root sections were put under the revealing X-Gluc agent, showing a uniform stain of the exposed tissue.

Finally, germinated embryos were subcultivated using the M5 development medium with the selective agent to higromycine and after 1 month in this medium, they continue to grow, expressing antibiotic resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Esquema del vector pHAGG constituido por los genes de quitinasa (TACH) y glucanasa, el gen reportero β -glucuronidasa (<i>uid A</i>) y el gen marcador higromicina (<i>hph</i>).	21
Figura 2. Diagrama del vector binario pBI121, el cual muestra los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB), el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el gen <i>nptII</i> para resistencia a kanamicina y el gen de la β -glucuronidasa (<i>uidA</i>) unido al terminador de la nopalina sintetasa (Nos ter).	22
Figura 3. Diferencias en la capacidad regenerativa de las suspensiones celulares en función de la calidad y la edad de cultivo. a. Curraré (38 meses) con mayor calidad y capacidad de regeneración. b. Gran Enano (12 meses) con menor calidad y capacidad de regeneración.	30
Figuras 4. Comparación de suspensiones celulares de los cultivares Curraré (AAB) y Gran Enano (AAA) antes de iniciar el bombardeo de microproyectiles. a. Suspensión celular del cv Curraré mostrando agregados celulares (<i>ag</i>) y células con contenido citoplasmático denso (10X). b. Corte histológico del cv Curraré que muestra células en división simétrica con núcleos (<i>n</i>) bien diferenciados. c. Células de Curraré (20X) con granos de almidón (<i>al</i>). d. Suspensión celular de Gran Enano (10X), se observa la heterogeneidad de la suspensión y la poca presencia de agregados celulares (<i>ag</i>). e. Corte histológico de la suspensión de Gran Enano (20X) donde se observa células vacías (<i>v</i>). f. Células (20X) con gran contenido de almidón (<i>al</i>). g-h. Células con división asimétrica y engrosamientos de las paredes celulares (20X).	32
Figura.5. Expresión transitoria del gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS) en suspensiones celulares de banano (cv Gran Enano) y plátano (cv Curraré) sometidas a	33
Figura 6. Observaciones microscópicas de los agregados celulares embriogénicos del cv Curraré mostrando la expresión transitoria de la β -glucuronidasa (GUS) después de 48 horas de realizado el bombardeo. a. Vista general de la suspensión celular después de 16 horas en presencia de la solución reveladora (4X). b. Agregado celular mostrando la tinción total del contenido celular(20X). c. Células translúcidas (<i>tr</i>) que no expresan el gen GUS (20X). d. Presencia del gen GUS en el interior celular (20X). e. Células en división (20X). f. Daño celular en células de Gran Enano, obsérvese la plasmólisis celular (<i>p</i>) y la presencia de núcleos y nucleolos poco diferenciados (20X).	37

- Figura 7.** Respuesta de cultivos celulares y embriogénicos del cultivar Curraré al medio de selección (M3 con higromicina 75 mg/l). a. Células necrosadas que no soportaron la selección. b. Células que sobrevivieron a la selección. c. Daños ocasionados por el agente selectivo, células plasmolizadas, completamente vacuoladas y con núcleos mal definidos (X). d. Células que soportaron la selección, obsérvese los grupos de células en división y con núcleos bien definidos (X). e. Formación de agregados celulares. f. Diferenciación de embriones globulares. g-h. Coloración azul de la masa celular indicando la expresión del gen GUS. i. Histología de la masa celular mostrando la expresión GUS en el tejido interno (X). j. Proembriones y células meristemáticas con gran contenido de almidón (X). k. Embriones en diferentes estados de desarrollo. i. Obsérvese un embrión bien formado (e). 40
- Figura 8.** Respuesta de cultivos celulares embriogénicos de los cultivares Curraré y Gran Enano al medio de selección (M3 con kanamicina 100 mg/l). a. Cultivos de Curraré mostrando un estado necrótico parcial. b. Cultivos de Gran Enano mostrando un estado necrótico uniforme. 41
- Figura 9.** Germinación y desarrollo de embriones somáticos del cv Curraré regenerados en medio de selección (M3 con higromicina 75 mg/l). a. Diferenciación de embriones sobre el medio de germinación M4. b. Embriones mostrando la diferenciación de los primordios foliares. c. Embriones mostrando las primeras hojas verdes. d. Embriones completamente germinados. e. Secciones de hoja de plantas en desarrollo que muestran la presencia del gen GUS. f. Secciones de raíz de plantas en desarrollo mostrando la presencia del gen GUS. 43
- Figura 10.** Plantas de Curraré en el medio de desarrollo M5. a. Plantas en presencia del agente selectivo. b. Plantas que no pasaron por los eventos de transformación genética. c. Embriones normales (*en*) y embriones muertos durante la selección (*em*). 44

LISTA DE CUADROS

En el Texto	Página
Cuadro 1. Evaluación del crecimiento en volumen (ml) de las suspensiones celulares de los cultivares Curraré y Gran Enano 8 días después del subcultivo, durante la fase de crecimiento exponencial. Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones por cultivar.....	29
En el Anexo	
Anexo 1. Medio de multiplicación M2.....	56
Anexo 2. Medio de regeneración M3	56
Anexo 3. Medio de cultivo M4.....	57
Anexo 4. Medio de cultivo M5.....	57
Anexo 5. Buffer de expresión transitoria (GUS).....	57
Anexo 6. Cuadro 2. Resultados de la cuantificación de los puntos azules en la expresión transitoria, respecto a los tratamientos.....	58
Anexo 7. Cuadro de sobrevivencia y muerte de las células después de permanecer 60 y 90 días en medio M3 con 75 mg/l higromicina	59
Anexo 8. Análisis del diseño estadístico y sus interacciones.	60

I. INTRODUCCION

La importancia económica de las especies vegetales tropicales a nivel mundial ha originado muchos estudios sobre su selección y mejoramiento. Sin embargo, aunque muchas de ellas son seleccionadas por su rendimiento o calidad nutricional, resultan vulnerables al ataque de patógenos (Cruz, 1998).

Las musáceas de interés comercial, el banano y el plátano, son seriamente afectadas por diversas enfermedades fungosas, virales y diferentes plagas, lo cual reduce el rendimiento y produce la pérdida de plantaciones y cosechas, en pequeña y gran escala. La enfermedad más devastadora es indudablemente Sigatoka negra, la cual es ocasionada por el hongo patogénico *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que causa necrosis en las hojas y reducción de la actividad fotosintética lo que origina una disminución en la producción (Sági *et al*, 1998). Este hongo fue descubierto en 1963 por Rhodes (1964) en las islas Fiji. Sigatoka afecta a todos los tipos de bananos y existe en muchas regiones bananeras; es de particular importancia en América Latina y el Caribe (Sági *et al*, 1998), y puede producir pérdidas de hasta el 30 al 50% (Stover, 1983, Mabambo, 1993). El control de la enfermedad en fincas comerciales causa el uso y abuso intensivo de pesticidas, especialmente por productores medianos y grandes. Los costos anuales por aplicaciones de fungicidas en el control de enfermedades se encuentran en el rango de \$600 a \$1800 por hectárea (Sági *et al*, 1998; Strobel *et al*, 1993).

El uso excesivo de productos químicos en la producción de bananos de exportación, ha dado como resultado la aparición de poblaciones de este patógeno resistentes a los fungicidas (Carlier, 2000). Este hecho, aunado al deterioro ambiental hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para resolver estos problemas (Strobel *et al*, 1993).

La producción de nuevas variedades resistentes a la Sigatoka negra y a otras enfermedades, por medio de tecnologías convencionales, ha sido limitada por la alta esterilidad y niveles de ploidía de los diferentes cultivares (Belalcázar *et al.*, 1995; Vuylsteke *et al.*, 1999). Nuevas variedades tolerantes a la Sigatoka negra han sido producidas por mejoramiento genético convencional, sin embargo, la aceptación de la fruta no es tan buena para exportación como la de las variedades comerciales susceptibles (Belalcázar *et al*, 1995; Nowakunda *et al.* 2000). La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), ha desarrollado una serie de variedades tetraploides de banano y plátano que muestran diferentes niveles de resistencia a la Sigatoka negra

(Belalcázar *et al.*, 1995), y algunas de ellas, resistentes a otros patógenos como es el caso de la marchitez causada por *Fusarium* (razas 1 y 4). Entre estas variedades se pueden citar están la FHIA-1 (AAAB), FHIA-3 (AABB), FHIA-17 (AAAA)| FHIA-20 (AAAB), FHIA-21 (AAAB) y FHIA-23 (AAAA) (Rowe, 1985; Mabambo *et al.* 1993). Estas variedades son una alternativa aceptable para minimizar los problemas causados por estos patógenos. Sin embargo sus cualidades organolépticas no son tan buenas como las de los cultivares comerciales de plátanos tipo Falso Cuerno, por lo tanto su aceptación en mercados internacionales y locales es todavía incierta (Nowakunda *et al.*, 2000). El avance de la biotecnología ha provisto de alternativas para el mejoramiento de cultivos a través de la manipulación directa de genes de interés comercial sin afectar otras características de los cultivos (Cruz, 1998). La ingeniería genética, ofrece la posibilidad de introducir características puntuales en variedades que tienen óptimas cualidades organolépticas. El uso de técnicas no convencionales como la transformación genética mediante el bombardeo de partículas ó a través de *Agrobacterium*, constituye una alternativa muy prometedora para el desarrollo de plantas resistentes a estas enfermedades (Crouch *et al.*, 1998). El aislamiento de genes de resistencia y el desarrollo de plantas transgénicas ofrece expectativas para resolver estos problemas en musáceas (Cruz, 1998).

En el año 2000 fue creado el Consorcio de la Genómica del banano, constituido por los miembros del grupo de trabajo en mejoramiento genético del Programa Global para el Mejoramiento de *Musa* (PROMUSA). Dicho consorcio tiene como objetivo permitir el desarrollo del plan maestro para el estudio de la genómica de las musáceas, bajo el auspicio de PROMUSA. El mejoramiento genético de las musáceas será fortalecido considerablemente con un mejor conocimiento del genoma a niveles molecular y cromosómico. Es necesario desarrollar las herramientas moleculares que permitan la localización y caracterización de genes en musáceas, para conferir características de interés como resistencia a plagas y enfermedades y calidad del fruto (PROMUSA 2000).

El establecimiento de alianzas estratégicas entre institutos que trabajan en diferentes áreas del mejoramiento genético es necesario para lograr avances importantes sin duplicar esfuerzos. A nivel regional se creó el Consorcio Latinoamericano de Biotecnología conformado por el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados de Irapuato, México (CINVESTAV); Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB) Colombia; Instituto de Biología de las Plantas (IBP), Cuba; Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y Corporación Bananera Nacional, SA (CORBANA),

Costa Rica y el cual tiene como objetivo desarrollar una red científica con recurso humano, infraestructura y conocimiento para beneficio del proceso de evaluación de las nuevas potencialidades de la biotecnología en la solución de problemas prácticos urgentes. El CATIE ha establecido una alianzas de colaboración científica con el Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV de Irapuato, México, para unir esfuerzos y obtener avances a corto y mediano plazo en ingeniería genética de musáceas de interés para la región. En este sentido, el CATIE cuenta con un sistema de multiplicación y regeneración masiva de cultivos celulares, único en el área, a través de la embriogénesis somática utilizando flores femeninas y masculinas (Escalant *et al.* 1994; Côte *et al.* (1996) y Grapin *et al.* 2000). El CINVESTAV tiene una gran experiencia en ingeniería genética, y actualmente ha desarrollado avances importatnes en la transformación genética de banano. La colaboración entre ambos centros puede ser muy importante dentro del marco de la transformación genética de musáceas.

La transformación genética se refiere a la transferencia de información genética a una célula bacteriana, vegetal o animal (Sági, 2000). Los sistemas más utilizados actualmente son la aceleración de partículas (biobalística) y el sistema de *Agrobacterium tumefaciens*.

El método de aceleración de partículas es dependiente de la existencia de un sistema de regeneración celular eficiente y de la competencia de las células del tejido utilizado. Con esta metodología se han transformado algunos cereales como trigo, maíz y arroz (Siemens y Schieder, 1996). Con el uso de este método se han resuelto algunos problemas, como el rango de hospedero (monocotiledóneas y dicotiledóneas), el cual se ve limitado en el caso de *Agrobacterium* (Birch, 1997).

En este sistema las variables a considerar para la transformación de tejido vegetal son: el sistema de aceleración (descarga eléctrica, presión por gases), el tamaño de las partículas, el *momentum* de las partículas, el pretratamiento del tejido (osmolaridad en el medio) y los factores fisiológicos del tejido seleccionado (Potrykus, 1991; Birch, 1997).

Algunas desventajas que presenta, tienen que ver con el daño ocasionado al material transformado y la distribución heterogénea de las partículas, que conduce a la expresión transitoria del transgén o a la muerte del tejido (Siemens y Schieder, 1996). En principio, cualquier tejido vegetal podría ser usado como blanco para la transformación por este método, de tal manera que hoy en día es uno de los métodos más promisorios para la transformación de plantas (Cruz, 1998).

El presente estudio pretende desarrollar una metodología para producir plantas de banano cv Gran enano (AAA) subgrupo Cavendish, y de plátano cv Curraré (AAB) subgrupo Plantain, con resistencia a Sigatoka negra a través de la transformación genética mediada por el bombardeo de partículas.

Este es el primer intento de transformación genética, a nivel mundial, del cv Curraré de consumo local en Latinoamérica, para obtener resistencia a enfermedades fúngicas. Se pretende con este trabajo la introducción y sobreexpresión de los genes que codifican para la β -1.3 glucanasa y quitinasa de clase I de tabaco. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas entre especies vegetales (Meins *et al*, 1992). También se ha demostrado que poseen actividad anti-fúngica *in-vitro*, lo cual se debe probablemente a que la quitina y el β -1.3 glucan son componentes importantes de la pared celular de los hongos.

1. Objetivos.

1.1.- Objetivo general

Contribuir al desarrollo de una metodología para la obtención de plantas de banano y plátano (cv Gran enano y Curraré) de consumo local con resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), utilizando la transferencia de genes a través del bombardeo de partículas.

1.2.- Objetivos específicos

1- Establecer las condiciones para la transformación genética de suspensiones celulares de banano y plátano (cv Gran enano y Curraré), a través de biobalística, utilizando genes marcadores, genes de selección y genes relacionados con la resistencia a Sigatoka negra (glucanasa y quitinasa).

2- Determinar las condiciones de recuperación de las suspensiones celulares de banano y plátano después de la transformación.

3- Realizar ensayos de expresión transitoria de los genes.

4- Realizar ensayos de expresión estable de los genes a través de métodos de selección con antibióticos (Higromicina y Kanamicina).

2. Hipótesis.

La técnica biobalística induce transformación genética de banano y plátano.

La expresión transitoria y estable de los genes transferidos es estimable.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Posición taxonómica y clasificación de las Musáceas.

Las plantas de banano y plátano son monocotiledóneas, se sitúan dentro de la familia Musáceae y orden Zingiberales. Esta familia esta constituida por dos géneros: *Musa* y *Ensete* (Soto, 1992; Jones, 2000). El género *Musa* se divide en cuatro secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys, y Eumusa. La mayoría de los bananos comestibles de la sección Eumusa tienen su origen en solamente dos especies silvestres: *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (Stover y Simonds, 1989). Las formas silvestres son diploides y fértiles, mientras que los genotipos cultivados son todos partenocárpicos y estériles, condiciones indispensables para obtener frutas comestibles. La esterilidad se debe a un complejo de causas: genes específicos de esterilidad, poliploidía y cambio estructural cromosómico (Soto, 1992).

Los elementos principales en la clasificación de los bananos comestibles son aquellos referidos a su origen y al conocimiento del número de cromosomas. De acuerdo con esto, se han identificado nueve grupos de cultivares con diferentes niveles de ploidía y aportes en el genoma (A= *acuminata* y B = *balbisiana*), desde los diploides ($2n = 2X = 22$) hasta los tetraploides ($2n = 4X = 44$) (Simmonds y Weatherup, 1990). Los triploides son comunmente los más numerosos, seguidos por los diploides y muy pocos tetraploides (Stover y Simmond, 1989). La triploidía confiere mayor vigor a la planta, mayor productividad y favorece la esterilidad (Soto, 1992).

Los grupos de los cultivares *acuminata* e híbridos, se designan por letras que indican su ploidía y su composición genómica. Se identifican con A los caracteres aportados por *M. acuminata* y por B los de *M. balbisiana* (Soto, 1992). Este autor señala que dentro de un grupo determinado pueden existir plantas que difieren del ideotipo; las cuales no pueden ser clasificadas como grupos aparte, por lo que se incluyen dentro de subgrupos, como en el caso del Subgrupo Cavendish que pertenece a los AAA y el Subgrupo Plantain de los AAB.

2.2. Botánica del género *Musa*.

Las Musáceas son plantas herbáceas, monocotiledóneas y perennes, con pseudotallos compuestos de vainas foliares, originadas de cormos en los que se desarrollan yemas laterales. La hoja consta de base o vaina foliar, pseudopetiolos y láminas. Las hojas nacen en espiral y el patrón filotáxico varía en las diferentes clases y especies. La inflorescencia es terminal y crece por el centro del pseudotallo hasta alcanzar el follaje donde emerge un racimo complejo, el cual consiste de un pedúnculo en el que las flores están distribuidas en racimos nodales; los racimos de flores y brácteas nacen en espiral y no rodean al pedúnculo (Soto, 1992).

Las flores femeninas, primeras en formarse, poseen ovario desarrollado, estilo grande y estambres reducidos, mientras que las masculinas presentan ovarios abortivos, estilo y estigma reducidos y anteras desarrolladas (Stover y Simmonds, 1989).

El desarrollo del ovario en los triploides comerciales ocurre sin la intervención del polen, el desarrollo del fruto o banano es partenocárpico (Soto, 1992).

2.3. Distribución e importancia.

Los bananos y plátanos (*Musa spp.*) se encuentran entre los cultivos comestibles más importantes. Constituyen una fuente significativa de alimentos para millones de personas de países tropicales y una fracción de la producción se exporta a países desarrollados; es el cuarto cultivo después del arroz, trigo y maíz (Frison y Sharrock 1998).

Los bananos y plátanos en su mayoría son de consumo local, principalmente por ser uno de los alimentos más baratos, son ricos en vitaminas y minerales, particularmente vitaminas A, C, B₆ y potasio y por tener un alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de grasa. La mayor parte de la producción se centra en África, Pacífico asiático, América Latina y el Caribe (Frison y Sharrock 1998).

La gran mayoría de los bananos y plátanos se producen para consumo local y son de vital importancia en la seguridad alimentaria de millones de personas alrededor del mundo. En África suministran más del 25% de los requerimientos energéticos para más de 70 millones de personas, en el Este de África proveen el alimento para más de 20 millones

de personas; en Asia cerca del 95% del área es cultivada con bananos y plátanos siendo uno de los más importantes cultivos de la región. Cerca del 70% de los bananos y plátanos cultivados en América Latina y el Caribe son consumidos localmente, en esa región los plátanos (AAB) juegan un papel muy importante en la alimentación (Frison y Sharrock 1998).

2.4. Plagas y Enfermedades de las musáceas.

Los mayores problemas en la producción de bananos y plátanos son las plagas y enfermedades que los atacan. Estos cultivos son infectados por un amplio rango de patógenos, hongos, virus, bacterias, nemátodos e insectos.

Entre las principales plagas está el insecto conocido como picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) que ataca el rizoma y el picudo del tallo (*Odoiporus longicollis*), los cuales limitan su producción (Padmanaban *et al.* 2001).

El otro grupo importante de patógenos, son los nemátodos los cuales se encuentran ampliamente distribuidos y pueden causar daños significativos a la producción. Entre ellos el nemátodo minador *Radopholus similis*, que ataca principalmente a los cultivares Cavendish subgrupo AAA y a los plátanos, cultivados principalmente en las zonas bajas (Sarah, 2000). Otros nemátodos que causan daños en la raíz son *Pratylenchus spp* y el nemátodo espiral *Helicotylenchus multicinctus* (Gowan y Queneherve, 1990; Sarah, 2000). El control normal es a través del uso de nemátocidas (Dale, 1999). La posible estrategia para obtener plantas de banano y plátano resistentes a estas plagas, utilizando ingeniería genética, puede consistir en la sobreexposición a inhibidores de proteasas, para bloquear la protinasa intestinal de estos organismos (Sagi, 1995).

Las musáceas también son afectadas por un número de enfermedades virales de las cuales, el virus "bunchy top" (BBTV) es el más importante. Este virus es miembro del grupo de los nanovirus recientemente descrito y es transmitido por el áfido negro del banano *Pentalonia nigronervosa* (Dale, 1999, Thomas *et al.* 2001). Otro virus importante es el virus del mosaico del banano (BBrMV); el cual es rápidamente distribuido por algunas especies de áfidos, causando pérdidas de hasta un 40% (Thomas *et al.* 2001). Otros virus importantes son el "banana streak" (BSV), y el "banana mosaic". Actualmente el control a estas enfermedades se produce cultivando material libre de virus, o bien

mediante la creación de plantas resistentes por medio de la ingeniería genética. La estrategia a seguir es utilizar genes o secuencias de genes del patógeno, llamada resistencia derivada del patógeno (PDR). Estos genes pueden codificar para componentes estructurales como la proteína de la cápside del virus ó componentes no estructurales involucrados en la replicación o movimiento de los virus, estas secuencias pueden ser expresadas en orientación sentido o antisentido (Sagi, 2000).

Las bacterias también representan un problema importante para el cultivo de banano y plátano. De ellas la más importante es la que provoca la enfermedad conocida como Moko cuyo agente causal es *Ralstonia solanacearum* (Yabuuchi *et al.* 1995). La infección ocurre vía raíces y rizoma, provoca amarillamiento y marchitez de las hojas y produce además necrosis de la hoja candela. Una vez establecida en el campo, es necesario realizar prácticas culturales como la erradicación de las plantas enfermas, debido básicamente a que no existen plantas resistentes a esta enfermedad (de Oliveira, 2000; Thwaites *et al.* 2000).

Otra de las limitantes en el cultivo de las musáceas son las enfermedades fungosas, por su importancia en las plantaciones comerciales y de pequeños productores de banano y plátano. Entre ellos el Mal de Panamá causado por *Fusarium oxisporium* f.sp. cubense (Foc). Esta es una enfermedad devastadora en cultivares susceptibles y ataca principalmente raíces, corno y pseudotallo. *Fusarium* coloniza sistemáticamente el xilema de cultivares susceptibles y causa una letal marchitez vascular. El hongo existe en un gran número de razas, entre las cuales tenemos la raza 1 y la raza 4 como las más importantes (Ploetz y Pegg, 2000). El cultivar Gros Michel es muy susceptible a la raza 1 y los cultivares Cavendish son susceptibles a la raza 4. El control de la enfermedad se puede llevar a cabo con cultivares resistentes y fuentes de resistencia que hayan sido identificadas (Dale, 1999). Se han encontrado nuevos tipos de proteínas antifúngicas con las cuales se pretende crear plantas transgénicas de banano y plátano resistentes a los hongos (Cammue *et al.* 1992), Sagi (2000) menciona diferentes mecanismos que pueden ser utilizados en la ingeniería genética para desarrollar plantas con resistencia a las diferentes enfermedades fungosas.

A pesar de todo lo anterior, se puede decir que la enfermedad fungosa de mayor importancia a nivel mundial es la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*).

2.4.1. Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*).

La Sigatoka negra fue observada por primera vez en febrero de 1963 en la región Sigatoka de la isla de Viti Levu en Fiji, de donde se dice que se propagó rápidamente, según Rhodes, citado por Carlier *et al.* (2000).

La Sigatoka negra, es una enfermedad ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (forma asexual *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, syn. *Cercospora fijiensis*) y es la enfermedad más destructiva en plantaciones comerciales (Sági *et al.* 1995). La susceptibilidad de los cultivares de banano y plátano al hongo, provoca el uso intensivo de pesticidas. Con el paso del tiempo la enfermedad se ha vuelto más virulenta y se ha diseminado a lo largo de las regiones tropicales de América Latina (Anon, 1998).

La primera aparición de la Sigatoka negra fuera de Asia se dio en Honduras en 1972 (Stover y Dickinson, 1976). Posteriormente la enfermedad se diseminó en Centro América siendo detectada en Costa Rica en 1979 (Stover, 1980), y posteriormente en otros países de Sur América, entre ellos Colombia, Ecuador, Venezuela y Brazil (Anon, 1998).

Esta enfermedad se encuentra distribuida ampliamente en muchas regiones y Muchos cultivares son susceptibles incluyendo el subgrupo Cavendish (Dale, 1999), causa considerables reducciones en la producción (arriba del 50%) si no se controla.

El control químico y la selección de plantas resistentes han sido, hasta la fecha, las únicas estrategias utilizadas para el control de esta enfermedad. En los cultivos a escala industrial destinados a la exportación, la utilización de fungicidas (de protección y sistémicos) se realiza en forma rutinaria. Esto, para los pequeños productores resultaría imposible de sufragar, dado el alto costo de los productos químicos empleados en las aplicaciones, (30% a 40% de sus costos totales de producción), esto sin mencionar, los severos daños al ambiente y la salud humana (Wesseling *et al.* 1996; Henríquez *et al.* 1997). Sin embargo este método de control comienza a ser insatisfactorio, ya que la aplicación constante de fungicidas sistémicos induce resistencia al producto. Debido a esto se hace necesario cada vez más aumentar las dosis del producto y realizar más de 40 aplicaciones por año o utilizar nuevos productos, lo que induce a una mayor contaminación ambiental (Stover, 1980; Dale, 1999; Carlier *et al.* 2000).

2.4.2. Mecanismos de defensa a hongos (Glucanasas y Quitinasas).

Durante su evolución las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa contra la agresión de patógenos y plagas. La reacción de hipersensibilidad de plantas al patógeno es un mecanismo de defensa natural muy eficiente, dirigido a inducir resistencia localizada, alrededor del sitio de infección y sistemáticamente en partes no infectadas de la planta (Brunner *et al.* 1998).

Dentro de la gran variedad de compuestos bióticos desarrollados por las plantas para defenderse, encontramos las endoquitinasas y las β -1,3-glucanasas. Considerando que los β -1,3-glucanos y la quitina están presentes en las paredes celulares de muchos hongos fitopatógenos, no es sorprendente que ambos grupos de endohidrolasas muestren propiedades antifúngicas. Estos dos tipos de endohidrolasas existen en dos formas: isoformas ácidas extracelulares e isoformas básicas vacuolares. Las endoquitinasas hidrolizan enlaces β -1,4-quitinasas de los homopolímeros de la quitina, la cual es un componente estructural de las paredes del micelio de muchos hongos (Wessels y Sietsma, 1981). Las β -1,3-glucanasas hidrolizan los enlaces β -1,3 que forman los glucanos (Shewry y Lucas, 1997; Simmons, 1994). Basados en su estructura primaria se han identificado tres clases de glucanasas; la clase I comprende isoformas básicas vacuolares, la clase II consiste de isoformas ácidas extracelulares y la única enzima clase III que ha sido identificada es una proteína ácida extracelular que presenta una homología del 54 al 59% con las isoformas de la clase II. Por otro lado basándose en el análisis estructural de sus genes, se han identificado tres clases de quitinasas. La clase I comprende isoformas vacuolares, con un dominio N-terminal de aproximadamente 40 aminoácidos con una estructura principal altamente conservada (Collinge *et al.*, 1993; Brunner *et al.*, 1998). La clase II es homóloga a la clase I y se localiza extracelularmente. La tercera clase son quitinas no relacionadas a las isoformas anteriores pero que sus genes codifican para proteínas homólogas a quitina en *Arabidopsis*. Las quitinasas incluyen miembros del grupo ácido y básico, los cuales se conoce que apuntan al apoplasto y a la vacuola respectivamente (Brunner *et al.*, 1998). De hecho es posible clasificar las glucanasas y las quitinasas en cuatro o cinco clases dependiendo de su similitud de secuencia, localización subcelular e inducibilidad (Sela-Buurlagee *et al.*, 1993). Las propiedades antifúngicas de las β -1,3-glucanasas y endoquitinasas han sido confirmadas en ensayos *in vivo*; los resultados muestran que la combinación de las dos enzimas da mucho mayor actividad que las proteínas individuales (Shewry y Lucas, 1997).

Observaciones similares en condiciones *in vitro* fueron realizadas por Collinge *et al.* (1993).

Al respecto, Zhu *et al.* (1994) mostraron que la co-expresión constitutiva de quitinas de arroz y la β -1,3-glucanasa de alfalfa en arroz da una mayor protección contra *Cercospora nicotianae*, que si se expresan las proteínas por separado, posiblemente por un efecto sinérgico de las hidrolasas sobre la pared celular del patógeno. Castaneda *et al.* (2000) bajo condiciones *in vitro* encontraron un efecto similar sobre el hongo Sigatoka negra en banano, determinando que las enzimas por separado no son inhibitorias del crecimiento del hongo. Sela-Buurlage *et al.*, (1993) mencionan la capacidad que tiene la quitinasa vacuolar clase I y la isoforma β -1,3-glucanasa de inhibir el crecimiento de diferentes tipos de hongos y Collinge *et al.* (1993) las probaron en condiciones *in vitro* y observaron que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium solani*.

2.5. La biotecnología como herramienta al mejoramiento de *Musa*.

El mejoramiento genético convencional de bananos y plátanos, especies poliploides de multiplicación vegetativa, sigue siendo difícil. Es un proceso complejo que implica la creación de poblaciones heterogéneas, su caracterización cualitativa y cuantitativa, la selección y experimentación de genotipos mejorados durante varios años y en diferentes lugares, que posibilitó la obtención de cultivares superiores (Dale, 1999; Vuylsteke, 1999).

La biotecnología puede intensificar la utilización de la variabilidad genética y superar ciertas barreras biológicas. En la década pasada la biotecnología ha sido precedida de un mayor impacto en el mejoramiento de las musáceas pero desafortunadamente los progresos también han sido lentos (Dale, 1999).

Hoy en día, el desarrollo de la biotecnología ofrece la posibilidad de obtener material libre de patógenos y plagas, además de ampliar la variación genética y lograr obtener, en un tiempo relativamente corto, nuevas líneas para selección y evaluación.

Las técnicas simples de cultivo de tejidos han facilitado enormemente la manipulación y mejoramiento del material genético de *Musa*. Se están aplicando las técnicas de genética molecular para perfeccionar el mejoramiento de *Musa* mediante el análisis del genoma y el desarrollo de sistemas de mejoramiento asistido por marcadores (Vuylsteke, 1999)

Las metodologías establecidas para la propagación de bananos y plátanos han sido extensamente estudiadas en los últimos años, por lo que actualmente se dispone de métodos muy eficientes para la propagación de distintos genotipos de *Musa*.

2.5.1 Embriogenesis somática y suspensiones celulares embriogénicas.

El principio de Humberlandt (1902), dice que cada célula vegetal, cualquiera que sea su especialización, si está viva y posee un núcleo, está en capacidad de producir una planta entera. Es decir, la totipotencia significa que cada célula vegetal mantiene la capacidad de expresar todo el potencial genético de la planta madre. Este principio se basa en los fenómenos de diferenciación y dediferenciación celular. La dediferenciación es el mecanismo que permite a una célula somática o especializada convertirse en una célula no diferenciada de tipo meristemático o embriogénico.

La embriogénesis somática es el proceso por el cual las células somáticas desarrollan plantas, a través de diferentes estados morfológicos característicos sin que se de la fusión de gametos. Este proceso ocurre naturalmente en una amplia gama de especies, tanto a partir de tejidos reproductivos como el núcleo y las células sinérgidas, así como a partir de tejidos somáticos (Williams y Maheswaran, 1986).

El proceso de la embriogénesis somática tiene diferentes etapas: a). Inducción de la embriogénesis somática, b). Proliferación del callo embriogénico, c). Expresión de la embriogénesis somática o formación de los embriones somáticos y d). Maduración y germinación de los embriones somáticos (Parrot, 1993).

La embriogénesis somática a partir de flores masculinas y femeninas descritas por Escalant *et al.* 1994, Côte *et al.* (1996) y Grapin *et al.* (1996, 1998, 2000), consiste en cortar las flores masculinas después de la formación del racimo. Los tejidos puestos en cultivo, constituyen las manos de las flores masculinas inmaduras aisladas de la yema en condiciones de esterilidad, colocando únicamente los rangos florales más cercanos al meristema terminal, con un tamaño inferior a 3 mm. Para el caso de las flores femeninas Grapin *et al.* (1998, 2000) mostraron que para establecer los cultivos, es necesario cortar las plantas en su base cuando parece que el meristema vegetal terminó de evolucionar en un meristema floral. Después se abren longitudinalmente los seudotallos para extraer la

yema joven y en condición estéril se aíslan las manos de flores de tamaño inferior a 3mm y se ponen en cultivo. Para el cultivar Curaré las yemas contienen menos de 20 manos diferenciadas.

Otro método para la obtención de la embriogénesis somática fue la establecida por Schoofs *et al.* (1997) en la Universidad de Lovaina, Bélgica, quienes obtuvieron embriogénesis somática y regeneración de plantas utilizando el meristema apical del brote (Scalps).

En musáceas, la proliferación del callo es posible en medio semi-sólido (Ma, 1991) ó en medio líquido. Sin embargo el método que resulta más interesante es el segundo, el cual permite establecer una suspensión celular embriogénica que se puede mantener por varios meses, permitiendo homogenizar el desarrollo del material para obtener un crecimiento sincronizado de los embriones y plantas regeneradas (Parrot, 1993).

A partir de los callos obtenidos en los procesos de embriogénesis somática se procede al establecimiento de suspensiones celulares que consisten de células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento. Estas suspensiones se pueden mantener por largos periodos por medio del suministro continuo de nutrientes.

El crecimiento de las suspensiones celulares comprende las siguientes fases: a) fase de latencia, b) fase exponencial, c) fase lineal, d) fase desaceleración progresiva y la e) fase estacionaria. La fase de latencia se observa cuando en un medio fresco se subcultivan suspensiones celulares que están en el período de crecimiento. En la fase exponencial o fase logarítmica, la tasa específica de crecimiento ó el aumento de la biomasa por unidad de concentración de la misma, es constante y medible. En la fase lineal, la tasa de crecimiento declina uniformemente con el tiempo. Esta declinación aumenta en la fase de desaceleración progresiva, para alcanzar finalmente la fase estacionaria, en la cual, no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células (Rosales, 1994).

Para caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares pueden ser útiles los siguientes parámetros: número de células, actividad mitótica, peso, turbidez y volumen (Szabados, *et al.*, 1991).

La embriogénesis somática en *Musa*, utilizando suspensiones celulares embriogénicas, ha sido materia de investigación desde 1962 (Novak, 1992). Se han desarrollado cuatro

métodos principales dependiendo de los diferentes explantes utilizados. En este sentido Novak *et al.* (1989), utilizaron la lámina foliar o fragmentos de rizoma de plantas producidas *in vitro*; Dhed'a *et al.* (1991), iniciaron el establecimiento de las suspensiones celulares con secciones pequeñas de yemas que se encontraban en proliferación sobre un medio líquido; Marroquín *et al.* (1993), Cronauer y Krikorian (1988), Escalant y Teisson (1988, 1989) establecieron suspensiones embriogénicas de embriones cigóticos inmaduros; Ma (1991), utilizó flores masculinas para iniciar el cultivo de suspensiones. Escalant *et al.* (1994a, 1994b), obtuvieron también tejidos embriogénicos a partir del cultivo de flores masculinas. Côte *et al.* (1996); Grapin *et al.* (1996), establecieron suspensiones celulares embriogénicas en *Musa* cv Gran enano con flores masculinas. Grapin *et al.* (1998), lograron establecer callos embriogénicos y suspensiones celulares embriogénicas de flores femeninas de *Musa* cv 'Curraré' con lo que la técnica se extiende potencialmente a todos los tipos de *Musa*.

Desde 1991 se realizan trabajos en CATIE, estableciendo y mejorando la técnica de embriogénesis somática. Actualmente se cuenta con un sistema de propagación masal y regeneración celular bien establecido, por lo que se dispone de una técnica competitiva fundamental para ser aplicada en mejoramiento genético no convencional.

2.5.2. Transformación genética.

La transformación genética puede ser definida como, la introducción e integración estable de genes dentro del genoma nuclear y su expresión en plantas transgénicas (Sági, 2000).

En todos los programas de biotecnología, la capacidad de trabajar directamente con variedades élites es extremadamente importante y el desarrollo de nuevas variedades es dinámico y está sujeto a constantes cambios debido principalmente a la capacidad mutagénica de los patógenos (Christou, 1993).

Mejoramiento molecular de plantas es el término ampliamente usado ahora para el mejoramiento no convencional de plantas cultivadas usando un rango de técnicas de biología molecular (Sági, 2000). Estas técnicas incluyen la identificación, aislamiento y caracterización de importantes genes codificados, tratados agrónomicamente y su introducción dentro de cultivares, vía transformación y regeneración *in vitro* (Sági, 2000).

La transferencia de nuevos genes dentro del genoma de la planta puede resultar en un incremento de la tolerancia al estrés abiótico, de la protección contra patógenos o enfermedades. Puede también mejorar las cualidades nutricionales y fisiológicas ó las propiedades de almacenaje. El mejoramiento molecular no puede ser considerado como una alternativa de mejoramiento clásico, es más que un instrumento complementario (Sági, 2000). Biólogos moleculares y mejoradores tradicionales necesitan trabajar juntos para indentificar genes de interés y probar en campo los cultivares transgénicos (Michelmore, citado por Sági 2000).

La prioridad del mejoramiento en banano es la generación de cultivares con resistencia a plagas y enfermedades. Sin embargo, el mejoramiento clásico, el cual está basado en la hibridación sexual, es seriamente limitado por un alto grado de esterilidad masculina y femenina en los cultivares comestibles más importantes (Sági, 2000).

El mejoramiento convencional es posible en muchas instancias, pero es necesario contar con un gran número de polinizaciones para obtener muy pocas semillas. Cultivares comercialmente importantes como el subgrupo Cavendish (AAA), no son fáciles de mejorar convencionalmente debido a su total esterilidad femenina. Las inflorescencias de muchos cultivares en el subgrupo Plátano (AAB) están completamente ausentes o gradualmente degeneradas. Por eso se hace necesario la introducción de características de resistencia por medio de la transformación genética, como potencial para validar las técnicas de mejoramiento genético (Sági, 2000).

En musáceas de interés comercial la transformación genética es bien justificada debido principalmente a que es un cultivo que presenta esterilidad, poliploidía y propagación vegetativa, por lo que el mejoramiento convencional es difícil de realizar (Sági *et al.* 1995; Remy *et al.* 1998; Becker *et al.* 2000).

Durante la última década, han sido probadas un amplio rango de técnicas de transformación genética y esto hace evidente que las células que son capaces de regenerar plantas pueden ser transformadas por uno de estos métodos, entre los más usados están el bombardeo de partículas o el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (Sági, 2000).

2.5.3. Bombardeo de partículas (biobalística).

El bombardeo de partículas (biobalística) usa la aceleración de micropartículas de metales pesados como el oro ó tungsteno cubiertos con ADN. Estas micropartículas penetran y liberan el ADN dentro de las células de la planta, para que luego sean seleccionadas y regeneradas por la planta (Russell, 1993; Sagi, 2000; Walden, 1995).

El empleo de bombardeo de microproyectiles de alta velocidad con partículas de metal es el método más ampliamente usado, debido principalmente a que tiene un amplio rango de hospederos y no es tan limitado como es el caso del método de transformación con *Agrobacterium* (Christou, 1993; Walden, 1995).

En banano las plantas transgénicas han sido producidas optimizando la técnica de aceleración de partículas bajo el bombardeo de partículas, para la transformación de cultivo de suspensiones celulares embriogénicas (Sági *et al.* 1995; Remy *et al.* 1998).

La introducción de genes foráneos por transformación genética no siempre confiere alto nivel de resistencia para las plantas transgénicas, como es lo ideal en plantas mejoradas tradicionalmente, pero puede protegerlas, facilitando la tolerancia de las plantas a algunos patógenos (Sági *et al.* 2000).

La transferencia de nuevos genes dentro del genoma de la planta puede resultar en el incremento de la tolerancia al estrés abiótico, protección contra plagas y enfermedades o puede mejorar las propiedades nutricionales, calidad fisiológica o propiedades de almacenaje (Sági, 2000).

Los primeros trabajos realizados en transformación genética de banano fueron llevados a cabo por Sági *et al.* (1994) y el cual trabajó con transformación genética por electroporación en protoplastos del cultivar Bluggoe, subgrupo AAB, logrando establecer las condiciones para la expresión transitoria con el gen GUS.

May *et al.* (1995) lograron recuperar plantas transgénicas de Cavendish, cv Gran Enano, por cocultivo de meristemas con *A. tumefaciens*. Remy *et al.* (1998) obtuvieron plantas transformadas del cultivar plantain "Three Hand Planty" (AAB) que expresaron el gen antifúngico con tolerancia a *Fusarium*, por medio del bombardeo de partículas en suspensiones celulares embriogénicas. Pérez *et al.* (1999), lograron transformación estable con *A. tumefaciens* en los cultivares Gran Enano, Williams, "Three Hand Planty"

y FHIA18. De igual manera Ganapathi *et al.*, (1999, 2001a, 2001b) con *A. tumefaciens* lograron obtener plantas transformadas del cultivar Rasthali (AAB), a partir de suspensiones celulares.

Becker *et al.* (2000) desarrollaron un método estable para la evaluación de la transformación y regeneración estable del cultivar Gran Enano por bombardeo de microproyectiles, utilizando suspensiones celulares embriogénicas de flores inmaduras masculinas.

La facilidad de la introducción del ADN en las células de las plantas a través del sistema de bialística combinado con un buen protocolo de regeneración (callos, cultivo de células, embriogénesis somática), constituye un sistema óptimo para realizar transformación genética en diferentes cultivos (Christou, 1993).

2.5.4. *Agrobacterium tumefaciens*.

Los sistemas de transferencia de genes basados en *Agrobacterium* explotan la habilidad de este organismo para transferir ADN a las plantas dicotiledóneas (Cruz, 1998). Durante la infección por *Agrobacterium tumefaciens*, un fragmento denominado T-ADN, el cual es parte del plásmido Ti (pTi, o plásmido inductor de tumor) se integra al genoma vegetal ocurriendo el fenómeno de transformación. También participan los genes de virulencia (*vir*) (Zupan y Zambryski, 1995, Cruz, 1998); que incluyen ocho operones (*vir A* a *vir H*), localizados en el plásmido Ti, y que codifican para los factores que actúan en la transferencia del T-ADN dentro del núcleo de la célula vegetal. Asimismo están involucrados los genes cromosomales (*chv*) que afectan la virulencia de la bacteria, los cuales participan en la unión de la bacteria con la célula vegetal (Zupan y Zambryski, 1995, 1997).

A. tumefaciens hace uso de diferentes vectores para la transformación:

- Vectores cointegrativos, son vectores intermediarios que se han desarrollado para que se pueda llevar a cabo la integración de los genes foráneos en el T-ADN. Son vectores pequeños que pueden ser manipulados en *Escherichia coli* y transferidos a *Agrobacterium*. Estos plásmidos no pueden replicarse en *Agrobacterium*, pero contienen segmentos de ADN homólogos que permiten la recombinación del

intermediario en la región del T-ADN para formar la estructura co-integrada (Cruz, 1998).

- Vectores binarios, son plásmidos intermediarios con estabilidad en *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, por lo que su origen de replicación funciona en ambas bacterias. Cuando el plásmido se introduce en *Agrobacterium* se puede replicar de manera independiente del plásmido Ti, el evento que ocurre es un reconocimiento por parte de las secuencias *Vir* a las secuencias del T-ADN presentes en el intermediario. Estos vectores son los más utilizados debido a su facilidad de manipulación (Walden, 1995. May, 1995)

Agrobacterium tumefaciens tiene algunas ventajas: a)- presenta una alta probabilidad de integración de copias únicas de los genes introducidos, b)- es un evento preciso porque generalmente sólo se integra el fragmento de los genes de interés de ADN, c)- es un sistema que puede ser usado en una gran cantidad de tejidos vegetales (Lupotto, 1999).

2.5.5. Importancia y uso de los cultivos embriogénicos y las técnicas de transformación genética en la lucha para la resistencia a Sigatoka negra.

Desde el punto de vista de la propagación de plantas, la embriogénesis somática se considera un método eficiente, considerando el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo (Villalobos y Thorpe 1991) y de superficie (Etienne *et al.* 1997). La embriogénesis somática ofrece algunas ventajas sobre la regeneración por organogénesis, entre ellas, la formación de organismos completos, que no requieren pasos separados de inducción de brotes y raíces (Parrot, 1993). Esto es particularmente ventajoso durante la transformación genética, donde sólo se desea cambiar una característica.

En las Musáceas, la embriogénesis somática es un proceso lento en el cual pueden transcurrir de dos a seis meses, desde el momento de la inoculación de los explantes hasta la aparición de los callos embriogénicos ó embriones somáticos. Sin embargo a partir de un pequeño volumen de suspensión celular de 0.01 ml es posible obtener de 200 a 300 embriones somáticos (Novak *et al.* 1989).

La capacidad de obtener mayor cantidad de embriones en áreas más reducidas de espacio, se puede llevar a cabo utilizando el cultivo en inmersión temporal. Esto asegura incrementos en las tasas de multiplicación y conversión de embriones en plantas en medio líquido, así como la producción de embriones somáticos de forma más sincronizada (Teisson *et al.* 1995; Escalant, *et al.* 1995; Bieberach, 1995; Gómez Kosky *et al.* 2000).

Etienne *et al.* (1997) lograron mayores tasas de recuperación de embriones somáticos en café, al comparar el sistema de inmersión temporal (recipiente RITA) con el sistema tradicional (medio de cultivo gelificado). De esta manera se logró la recuperación de 9000 plántulas en un solo RITA, comparado con 1500 frascos de vidrio necesarios para producir la misma cantidad de plantas. Asimismo, estos autores obtuvieron una mayor sincronización y homogenización de los embriones con el sistema de cultivo en inmersión temporal.

En este sistema los embriones somáticos se multiplican en cascada a través del fenómeno de embriogénesis somática adventicia, cada embrión forma 4 o 5 embriones nuevos, los cuales se separan dando continuación al proceso. La germinación alcanza tasas de hasta un 80% y el crecimiento se obtiene transfiriendo los embriones a otra unidad de inmersión con los medios de germinación y desarrollo respectivamente (Escalant *et al.* 1994a, 1995).

Un sistema de regeneración masiva de plantas por embriogénesis somática ofrece la posibilidad de realizar transformación genética directa e indirecta, mediante la transferencia de genes a los embriones somáticos, o usando las suspensiones celulares como fuente de células para la transformación celular; potencialmente estos tejidos son un blanco ideal para la transformación genética (Becker *et al.* 2000; Schoofs, *et al.* 1995).

En la constante lucha por lograr plantas resistentes a Sigatoka negra, la técnica de inmersión temporal es muy beneficiosa para lograr la multiplicación de las células transformadas y la posterior regeneración de plantas con la característica de resistencia integrada en su genoma, en un menor tiempo y con mayor homogeneidad de las plántulas en crecimiento (Escalant *et al.* 1994).

III.- MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del estudio

El trabajo se realizó en los Laboratorios de Biotecnología del CATIE, Turrialba, Costa Rica, y en el laboratorio del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, México.

Las actividades del proyecto comprendieron dos fases:

- la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas de banano y plátano.
- la transformación genética de las suspensiones celulares, a través de la metodología de bombardeo de partículas.

3.2. Materiales

3.2.1. Material vegetal

Se utilizó suspensiones celulares de banano, cultivar 'Gran Enano' (*Musa spp.* Grupo AAA, subgrupo Cavendish) de doce meses de edad, y de plátano, cultivar 'Curraré' (*Musa spp.* grupo AAB, subgrupo Plantain) de 38 meses de edad, iniciadas y multiplicadas en el Laboratorio de Biotecnología del CATIE. Las suspensiones utilizadas durante la experimentación fueron tomadas en la fase de crecimiento exponencial, entre siete y diez días después del subcultivo.

3.2.2. Vectores de transformación

Plásmido pHAGG.

Este plásmido fue construido y proporcionado por el CINVESTAV y está constituido por los siguientes genes (Fig. 1):

- el gen reportero β -glucuronidasa (*uid A*)
- el gen marcador con resistencia al antibiótico higromicina (*hph*)

- los genes de la β -1.3 glucanasa y quitinasa de la clase I de tabaco utilizados para inducir resistencia a *Mycosphaerella fijiensis*.

Los genes están clonados bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S).

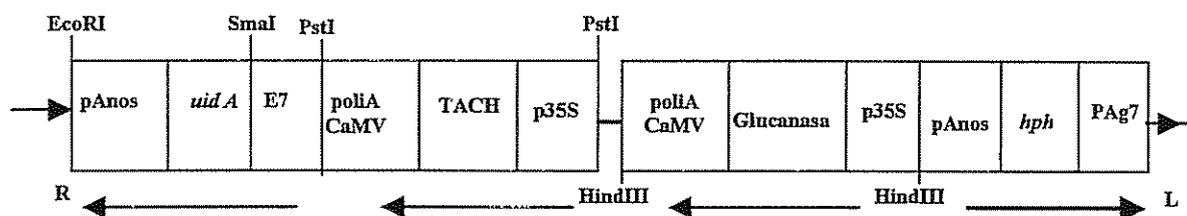


Figura 1. Esquema del vector pHAGG constituido por los genes de quitinasa (TACH) y glucanasa, el gen reportero β -glucuronidasa (*uid A*) y el gen marcador higromicina (*hph*).

Plásmido pBI121

El plásmido pBI121, se utilizó como control, y además permitió optimizar condiciones de transformación. Para el presente estudio, este plásmido fue proporcionado por el CINVESTAV, aunque normalmente es obtenido de los Laboratorios Clontech.

La construcción pBI121 está constituida por los siguientes genes (fig. 2):

- el gen reportero de expresión transitoria *uid A*
- el gen marcador con resistencia al antibiótico kanamicina (*nptII*)

Los genes están clonados bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S).

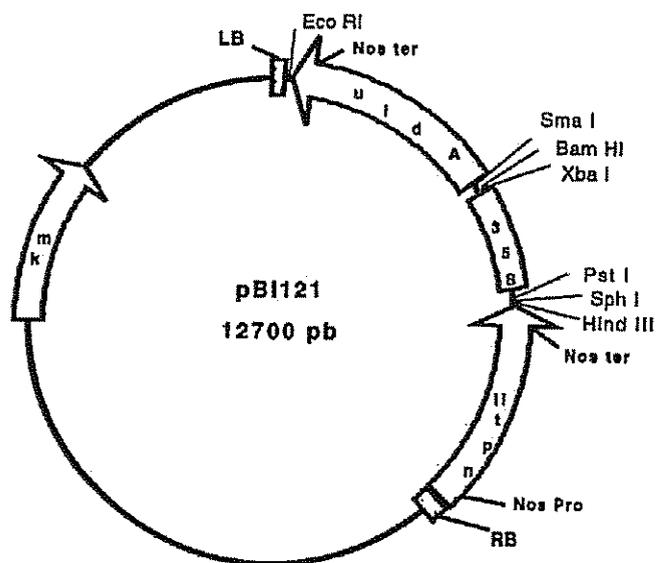


Figura 2. Diagrama del vector binario pBI121, el cual muestra los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB), el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el gen nptII para resistencia a kanamicina y el gen de la β -glucuronidasa (uidA) unido al terminador de la nopalina sintetasa (Nos ter).

3.2.3. Pistola para bombardeo de partículas

Se utilizó el sistema de aceleración de partículas, Biobalística PDS-1000/HE de BIO-RAD.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparación de las suspensiones celulares

Todas las suspensiones fueron iniciadas y mantenidas siguiendo el protocolo descrito por Côte *et al.* (1996). Las suspensiones celulares se multiplicaron en el medio M2 (Anexo 1) como lo reporta la literatura (Côte *et al.* 1996; Grapin *et al.* 1996).

El procedimiento previo al bombardeo de partículas incluyó la preparación de las suspensiones en varios pasos:

- Disponibilidad de suspensiones celulares entre 7 y 10 días después del subcultivo (fase exponencial de crecimiento).
- Tamizaje de las suspensiones 7 a 10 días antes del bombardeo utilizando filtros de 250 – 500 μm , con el propósito de lograr mayor uniformidad celular.
- Eliminación gradual del medio líquido hasta obtener una relación celular de 1 ml de células en 5 ml de medio líquido (0.2 ml célula/ml de medio líquido).
- Del volumen resultante, se resuspendió el contenido celular y se dispensó en alícuotas de 1 ml sobre discos de papel filtro (Whatman n° 4) de 5.5 cm. Esto se realizó colocando el filtro en el recipiente de filtración Nalgene, aplicando vacío para distribuir homogéneamente las células sobre el papel filtro.
- El papel filtro con las células se colocó en cajas Petri conteniendo el medio de multiplicación celular M2 suplementado con un acondicionador osmótico, el cual consistió de 18 g/l manitol y 18 g/l sorbitol. El medio fue gelificado con 7 g/l de agarosa (Sigma) y el pH fue ajustado 5.3.
- Las células permanecieron en el medio osmótico 24 horas antes y 24 horas después del bombardeo.

3.3.2. Preparación de plásmidos

La clonación de los genes de Quitinasa y Glucanasa fue realizada en el CINVESTAV-Irapuato, México para el caso del pHAGG (20 kb) que deriva del vector binario pGPTV-*hpt* construido por Becker *et al.* (1999). Este plásmido se encuentra clonado en XL1 Blue, en medio de cultivo LB con 50 mg/l de kanamicina, siendo necesario realizar una maxipreparación para aislar y purificar el ADN plasmídico.

El plásmido pBI121 es un vector binario, derivado del BIN 19 que contiene las secuencias repetidas del plásmido pTIT7 para la integración del T-ADN a células vegetales. Este plásmido se encuentra clonado en XL1 Blue, en medio de cultivo LB con 50 mg/l de kanamicina, siendo necesario realizar una maxipreparación para aislar y purificar el ADN plasmídico (Frisch *et al.* 1995).

3.3.3. Preparación de microproyectiles

Durante el bombardeo se comparó la efectividad del uso de partículas de oro y tungsteno de Bio-Rad de 1 μm de diámetro. Las partículas fueron preparadas de acuerdo al procedimiento descrito por Becker *et al.* (2000). Para tal efecto 60 mg de partículas de oro ó tungsteno fueron lavadas tres veces en etanol y tres veces en agua destilada estéril antes de suspenderlas en 1 ml de glicerol estéril al 50% (v/v). Antes del bombardeo los microproyectiles fueron preparados mediante la sonicación de 25 μl de partículas de oro ó tungsteno por 30 segundos, seguido de la mezcla con 2 μg del plásmido ADN, 25 μl de CaCl_2 (2.5 M) y 5 μl de espermidina base libre (0.1 M).

3.3.4. Condiciones de bombardeo

El bombardeo se realizó utilizando alícuotas de 5 μl de preparación de microproyectiles cubiertos con el ADN de interés en cada disparo. Se evaluó dos distancias de disparo (6 y 9 cm) dentro de la cámara de bombardeo y dos presiones de gas Helio, para lo cual se

utilizó diferentes tipos de membranas de ruptura (1100 y 1350 psi). En cada bombardeo se utilizó 1 μ g de ADN y cada muestra de suspensión celular fue bombardeada una vez.

Seguidamente el material bombardeado se incubó en platos Petri, los cuales fueron colocados en un cuarto de cultivo a la oscuridad a 27°C \pm 1°C durante una noche.

Para poder establecer la mejor condición de bombardeo se utilizaron suspensiones celulares de los cultivares Gran Enano y Curraré. Como testigo se utilizó suspensiones celulares no bombardeadas.

3.3.5. Recuperación y regeneración de suspensiones celulares transformadas.

El material bombardeado y no bombardeado permaneció durante 24 horas en el medio M2 osmótico después del evento de transformación. Posteriormente fue transferido al medio de regeneración M3 (Anexo 2) donde permaneció 10 días para la recuperación celular. En esta etapa el medio M3 no contiene los agentes selectivos, la higromicina para el pHAGG y la kanamicina para el plásmido pBI121.

Seguidamente las células fueron sometidas al agente selectivo (higromicina ó kanamicina) en el medio M3 hasta la recuperación de agregados celulares. Las células fueron subcultivadas y transferidas cambiando el papel filtro con los agregados celulares a medio fresco cada 45 días, hasta la proliferación de embriones somáticos en estado globular.

3.3.6. Análisis de la expresión transitoria *uidA* β -glucuronidasa (GUS).

El análisis histoquímico para determinar la expresión transitoria del gen GUS se llevó a cabo 48 horas después del bombardeo, según lo descrito por Sági *et al.* (1995). Para tal efecto después de cada disparo, se recuperó células bombardeadas en 1 ml de medio M2 y la solución se colocó en un plato Petri pequeño para su homogenización. De esta solución se tomó 0.5 ml, y se agregó al buffer de expresión transitoria (X-Gluc) para ser incubado durante 24 horas a 37°C (Anexo 5). El número de puntos azules fue cuantificado colocando la muestra sobre una cuadrícula y el conteo visual se realizó con la ayuda de un estereoscopio. El resto de la solución fue colocada en el medio M3 sin

antibióticos para facilitar la regeneración celular durante los primeros 10 días después del bombardeo, sin ser expuesto a un estrés adicional (selección).

3.3.7. Análisis de la expresión estable utilizando resistencia a antibióticos

La evaluación de la expresión estable del gen de resistencia a antibióticos se llevó a cabo en el medio M3 con 100 mg/l de kanamicina (Becker *et al.* 2000) y 50 mg/l de higromicina (Sági *et al.* 1995).

El material celular transformado (0.5 ml/Petri) y no transformado de los dos cultivares estudiados (Gran Enano y Curraré) se colocó en medio M2 de multiplicación celular conteniendo 100 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de higromicina, y 7 g/l de agarosa.

Este experimento se evaluó mediante el análisis de las células muertas (secciones necrosadas) y las células sobrevivientes al tratamiento de selección.

3.3.8. Análisis histológico

Con el fin de documentar el estado celular de las suspensiones celulares a utilizar antes y después del bombardeo de partículas se realizó un estudio histológico a diferentes niveles:

- Muestras de suspensiones celulares, tomadas inmediatamente antes del bombardeo de partículas.
- Muestras sometidas a la prueba de la expresión transitoria con el gen GUS, en el momento de la expresión de la coloración azul de las células.
- Muestras de cultivos celulares tomados después de la prueba de selección con los antibióticos kanamicina e higromicina.

Cada una de estas muestras se colocó en bloques de agar-agua al 1% antes de procesarlos, para evitar la disgregación de los cultivos celulares. Luego, cada muestra fue colocada en un fijador (Glutaraldehído: paraformaldehído) durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron con buffer fosfato a pH 7.2, la deshidratación de las muestras

se realizó con una serie ascendente de etanol (50, 70, 80, 90, 95, 100, 100), con cambios de 1 hora en cada concentración de alcohol.

Seguidamente se realizó la infiltración en Histo-resina a 4°C durante una noche, y la preparación de los bloques. Los cortes se realizaron a 4 µm, de grosor. La tinción se hizo con la técnica Naphtol Blue Black. Los reactivos y el protocolo de esta técnica es: 2,4-Dinitrophenyl Hidrazine (15 minutos), ácido periódico (10 minutos), Schiff (10 minutos a la oscuridad), Schiff-Naphthol Blue Black (4 minutos en baño María a 38°C). En todos estos pasos se debe realizar un lavado posterior al tiempo de inmersión. Finalmente las muestras se colocaron en ácido acético al 7% con tres 3 cambios a intervalos de 1 minuto.

3.3.9. Variables a estudiar

El estudio comprendió las siguientes variables:

- Expresión transitoria del gen GUS mediante el conteo de puntos azules, a diferentes distancias de disparo (6 y 9 cm) contra diferentes presiones de gas Helio (1100 y 1350 psi), dos plásmidos diferentes (pHAGG y el pBI121), y dos microproyectiles diferentes (oro y tungsteno).
- Supervivencia de las células (cv Gran Enano y cv Curraré) en contacto con los antibióticos de selección (kanamicina e higromicina), para todas las variables antes mencionadas. La supervivencia indica la presencia en la célula de los genes que expresan resistencia a los antibióticos.

3.4. Recolección de datos

3.4.1. Diseño experimental

En esta investigación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) y diseño de tratamientos en arreglo factorial 2⁵ con 3 repeticiones. Este arreglo factorial genera 32 tratamientos (Anexo 6), que con las 3 repeticiones por tratamiento, da un total de 96 unidades experimentales.

Factores:

A_i = Presión (1100 y 1350 psi)

B_j = Distancia de disparo: (6 y 9 cm)

C_k = Microproyectiles: (oro y tungsteno)

D_l = Cultivares: (Gran Enano y Curraré)

E_m = Plásmidos: (pHAGG y pBI 121)

Modelo matemático simplificado:

$Y_{er} = \mu + T_i + E_{ij}$ con: Y_{er} = Variable respuesta

μ = Media general

T_e = Efecto de tratamiento desde $e = 1$ a $e = 32$

E_{er} = Error experimental en la repetición r con el
tratamiento e ; $r = 1$ a $r = 32$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Factores que influyen en la eficiencia del bombardeo.

4.1.1 Calidad de las suspensiones celulares

La multiplicación de las suspensiones celulares de banano y plátano se presentó de forma normal, utilizando el protocolo ya establecido por algunos autores (Côte *et al* 1996; Grapin *et al.* 1996; 1998, 2000). Para ambas suspensiones se trabajó con una densidad de 0.3 ml de células/ml de medio de cultivo. Ocho días después del subcultivo en el medio M2 el incremento en el volumen celular fue de 400 % (6.06 ml) para el cultivar Curraré y de 153 % (2.3 ml) en el cultivar Gran Enano (Cuadro 1). En este periodo de tiempo es cuando la suspensión celular experimenta la fase de crecimiento exponencial, y es el momento adecuado para iniciar los eventos de transformación. Se aprovecha la etapa de activa división celular y la viabilidad que presentan las células en esta fase.

Cuadro 1. Evaluación del crecimiento en volumen (ml) de las suspensiones celulares de los cultivares Curraré y Gran Enano 8 días después del subcultivo, durante la fase de crecimiento exponencial. Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones por cultivar.

	Cultivar	
	Curraré	Gran Enano
Días de cultivo	Promedio (ml)	Promedio (ml)
0 días	1.5	1.5
8 días	6.07a	2.3b

Igual que se observó una tasa de multiplicación diferente para cada cultivar reflejando diferencias estadísticas altamente significativas, también se mostró, contrario a lo esperado, diferencias en la capacidad regenerativa de las suspensiones, (Fig.3) siendo superior para el cultivar Curraré con suspensiones de mayor edad (38 meses). Estos resultados posiblemente están relacionados con la calidad de la suspensión celular así como con la gran diferencia de edad entre ellas. Estas observaciones coinciden con algunos autores quienes consideran que la edad de las suspensiones celulares juega un

papel muy importante al momento de llevar a cabo los eventos de transformación. Las células jóvenes en la fase de crecimiento exponencial son los blancos óptimos para la transformación por el método de biobalística debido a que son células sanas, receptivas a la transformación y que pueden resistir el estrés del bombardeo (Ded'a *et al.*, 1991; Sanford *et al.* 1993; Becker *et al.* 2000).

Sin embargo Becker *et al.* (2000) consideran que suspensiones celulares recién establecidas no favorecen la obtención de plantas transgénicas de Gran Enano, logrando constatar que las suspensiones celulares bombardeadas alcanzaron su más alta capacidad regenerativa después de seis meses de establecidas. Asimismo, Sági *et al.* (1995) lograron mejores resultados al bombardeo cuando utilizaron suspensiones celulares del cv Bluggoe de dos años.

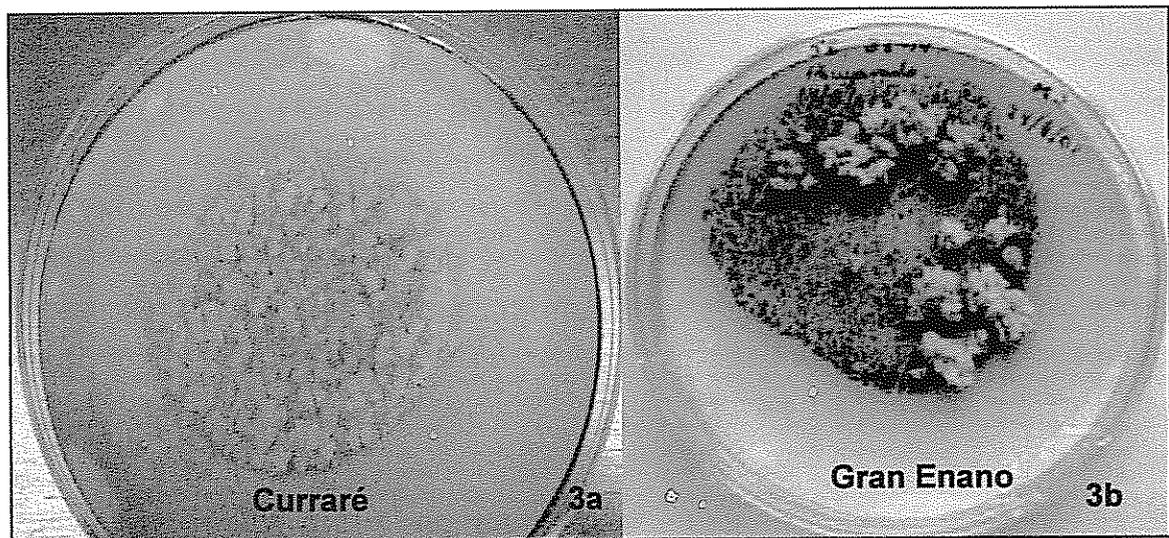


Figura 3. Diferencias en la capacidad regenerativa de las suspensiones celulares en función de la calidad y la edad de cultivo. **a.** Curraré (38 meses) con mayor calidad y capacidad de regeneración. **b.** Gran Enano (12 meses) con menor calidad y capacidad de regeneración.

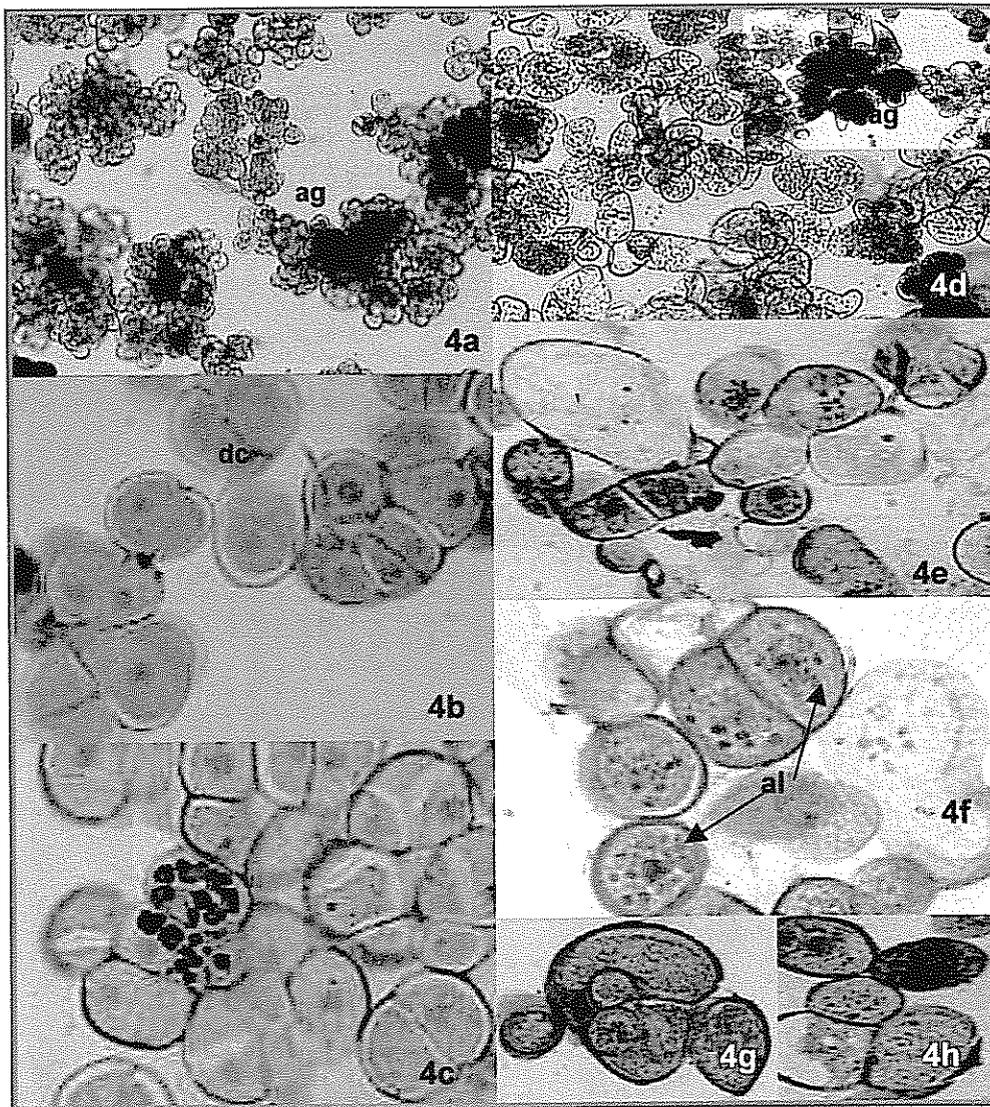
Al observar las suspensiones al microscopio se pudo constatar, que en efecto, hay diferencias con respecto a la calidad de las mismas entre cultivares (Fig. 4). En la Figura 4a se observa para el cultivar Curraré la presencia de agregados celulares bien definidos

y de células con contenido citoplasmático denso, lo que permite identificar una suspensión celular muy homogénea, constituida por células que tienen una gran capacidad regenerativa.

El estudio histológico permitió observar en detalle la calidad de esta suspensión, la cual muestra células muy turgentes con un citoplasma denso, haciendo notar la presencia de núcleos grandes bien definidos con nucleolos claramente diferenciados. Además se pudo observar que la mayoría de las células están en activa división celular (Fig. 4b). En algunas células más viejas se observan granos de almidón (Fig. 4c), mientras que en las células jóvenes que están en constante división no se presentan esas estructuras almidonosas (Fig. 4b). Tomando en cuenta el número de células con estas características podríamos considerar que un 90% de las células embriogénicas son de muy buena calidad. Estos resultados coinciden con las observaciones de Grapin *et al.* (1998, 2000), quienes mencionaron la presencia de proteínas solubles y pequeñas vacuolas con precipitados proteicos en este tipo de células.

Contrariamente la suspensión celular del cultivar Gran Enano muestra una gran heterogeneidad en su contenido celular (Fig. 4d). Se observan células de forma alargada, en bastón, vacías y sin contenido citoplasmático. Además existen muy pocos agregados celulares, lo cual es un indicativo de que la suspensión de Gran Enano es de calidad celular inferior. La histología de esta suspensión confirma estas observaciones al mostrar que predominan células de mala calidad, vacías (Fig. 4e), con agrupamientos de gránulos de almidón (Fig. 4f) y una gran cantidad de ellas con divisiones asimétricas (Fig. 4g). En muchas células el núcleo está plasmolizado, y tanto las células aisladas como los agregados celulares, muestran paredes engrosadas lo cual no es observable en las células de Curraré (Fig. 4h). Estas observaciones concuerdan con la caracterización morfohistológica realizada por Georget *et al.* (2000) quienes identificaron cinco tipos celulares, indicando que la presencia en Gran Enano de un tipo u otro está relacionado con la edad de la suspensión celular.

En este trabajo se sugiere que tanto la presencia de almidón en grandes cantidades como el engrosamiento de las paredes celulares podrían constituir barreras físicas que limitan la penetración de los proyectiles al interior celular.



Figuras 4. Comparación de suspensiones celulares de los cultivares Curraré (AAB) y Gran Enano (AAA) antes de iniciar el bombardeo de microproyectiles. **a.** Suspensión celular del cv Curraré mostrando agregados celulares (*ag*) y células con contenido citoplasmático denso (10X). **b.** Corte histológico del cv Curraré que muestra células en división simétrica con núcleos (*n*) bien diferenciados. **c.** Células de Curraré (20X) con granos de almidón (*al*). **d.** Suspensión celular de Gran Enano (10X), se observa la heterogeneidad de la suspensión y la poca presencia de agregados celulares (*ag*). **e.** Corte histológico de la suspensión de Gran Enano (20X) donde se observa células vacías (*v*). **f.** Células (20X) con gran contenido de almidón (*al*). **g-h.** Células con división asimétrica y engrosamientos de las paredes celulares (20X).

4.1.2- Tipo de microproyectil (oro y tungsteno)

Estadísticamente no se observó diferencias significativas con respecto al tipo de microproyectil (oro y tungsteno) utilizado durante el bombardeo (Anexo 8).

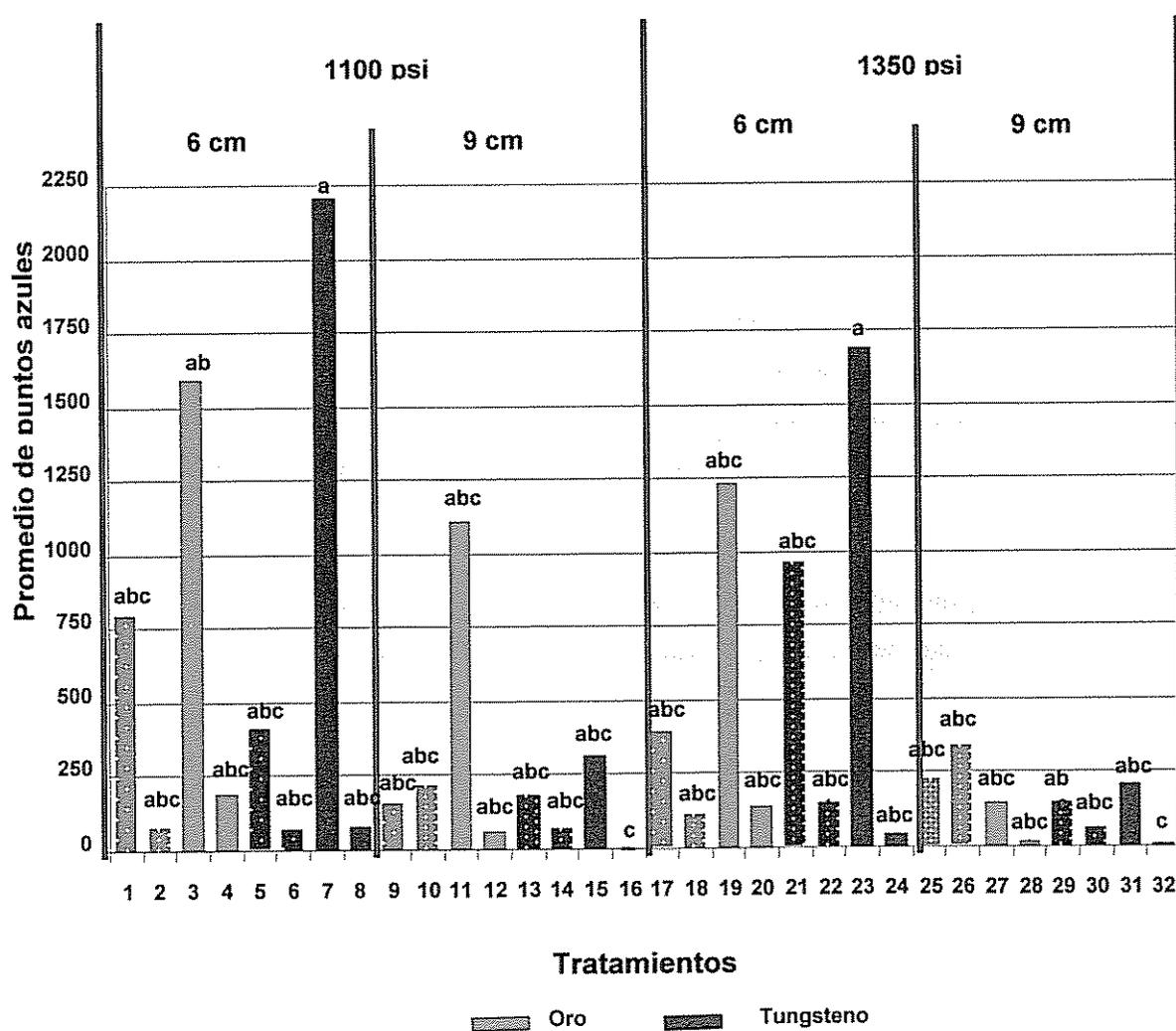


Figura.5. Expresión transitoria del gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS) en suspensiones celulares de banano (cv Gran Enano) y plátano (cv Curraré) sometidas a diferentes condiciones de bombardeo. Las medias con la misma letra no difieren según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Sin embargo, al analizar las medias de los tratamientos (Fig. 5, Anexo 6) representadas a través del conteo de puntos azules (expresión transitoria del gen de la β -glucuronidasa, GUS), se observó que la mayor eficiencia se obtuvo en los tratamientos 7 y 23 con el microproyectil de tungsteno y para el cultivar Curraré.

Estos resultados contradicen en parte la opinión de otros autores quienes relacionan las partículas de tungsteno, con una baja eficiencia en la obtención de la expresión transitoria (Russell *et al.* 1992; Sanford *et al.* 1993). Estos autores consideran que si bien el tungsteno tiene la ventaja de ser más barato y de estar disponible bajo la forma de diferentes agregados, presenta partículas extremadamente irregulares en forma y tamaño, es potencialmente tóxico para ciertos tipos de células, y está sujeto a la oxidación, lo que puede alterar la unión con el ADN, acelerando el proceso de degradación del mismo. Contrariamente las micropartículas de oro, son esféricas y más uniformes, lo que permite optimizar su tamaño para cada tipo de célula. Además, el oro tiene la cualidad de ser biológicamente inerte, no es tóxico y no modifica la velocidad de reacción del ADN al ser delimitado por éste. No obstante, el oro tiene la desventaja de formar aglomerados irreversibles en soluciones acuosas, por lo que no se recomienda prepararlo muchos días antes de su uso (Russell *et al.* 1992; Sanford *et al.* 1993).

Otros autores consideran que independiente del tipo de partícula hay factores como el tamaño adecuado de las partículas, las condiciones de almacenamiento y la preparación antes del bombardeo, que se deben tomar en cuenta para tener éxito en biobalística (Sanford *et al.* 1993; Potrikus *et al.* 1998).

4.1.3. Vectores de transformación

El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los dos vectores de transformación (Anexo 6, Anexo 8), siendo el plásmido pHAGG el que presenta los promedios más altos del conteo de puntos azules durante la expresión transitoria (Fig. 5). Esto se refleja principalmente en los tratamientos 3, 7 y 23 del cultivar Curraré donde se obtuvieron valores promedio de 1596, 2207 y 1692, respectivamente. Estos valores se reflejan en la capacidad de regeneración que mostraron estos tratamientos en la etapa de selección (Anexo 7). Consideramos estos resultados de gran valor, debido a que este vector de transformación es el portador de los genes de quitinasa y glucanasa que confieren la resistencia a la Sigatoka negra en banano y plátano.

Los resultados obtenidos con el vector de transformación pBI121, portador del gen marcador que confiere resistencia a la kanamicina, no fueron lo esperado. El número de puntos azules obtenido para ambos cultivares en las mismas condiciones no fue muy elevado y en algunos tratamientos (16, 28, 32) los eventos de expresión transitoria fueron muy bajos (Fig.5, Anexo 6).

En el caso de Gran Enano es posible que la calidad celular también afectara la capacidad de inserción de los genes en el interior celular.

4.1.4. Presión y distancia durante el bombardeo

Aparentemente la variable presión de gas Helio (1100 y 1350) no fue un factor determinante de la expresión transitoria. Con ambas presiones de Helio se logró tener resultados satisfactorios, conservando los otros factores de variación (Anexo 6).

Con respecto a las distancias de bombardeo utilizadas (6 y 9 cm) la situación fue diferente, ya que entre ellas se observó diferencias estadísticamente significativas, con un alfa \leq al 0.05 (Anexo 8). El Cuadro 2 (Anexo 6) muestra los datos obtenidos para la expresión transitoria donde el mayor número de puntos azules se observó en los tratamientos (3,7,19,23) con una distancia de disparo de 6 cm. La interacción de las dos variables (presión/distancia) no mostró diferencias estadísticas significativas (Anexo 8). Sin embargo, al analizar las medias de los tratamientos, la interacción presión 1100 psi contra la distancia de 6 cm, mostró los mejores resultados en los datos obtenidos a través de la expresión transitoria (Fig.5, anexo 6).

De los pocos estudios realizados con bombardeo de partículas en banano, la mayoría han utilizado el sistema de baja presión (Sági *et al* (1995). Estos autores trabajaron con células embriogénicas de banano del cv Bluggoe y determinaron la distancia de 4 cm como óptima para el bombardeo. A esta distancia y a baja presión (70psi) lograron más de 800 puntos azules en 25 mg de células. En otras monocotiledóneas se han obtenido valores de hasta 8702 puntos azules en 100 mg de células en maíz (Vain *et al*. 1993) y de 422 puntos azules sobre 300 mg de células en arroz (Wang *et al*. 1988).

Finner *et al* (1992), utilizaron un sistema de bombardeo de baja presión (60 psi) en suspensiones celulares de maíz y encontraron diferencias respecto a la distancia de

bombardero al evaluar la expresión transitoria. La distancia de 17 cm fue superior comparada con distancias mayores o menores. Asimismo, a esa distancia pero a una presión superior (80 psi) se obtuvo mayor cantidad de puntos azules, aunque la pérdida de células por expulsión fue mayor.

Sandford *et al.* (1993) consideran que a mayor distancia de disparo se reduce el impacto de velocidad mejorando la dispersión de las partículas, mientras que a distancias muy cortas combinado con grandes descargas de proyectiles se puede provocar grandes velocidades de lanzamiento. Es posible que con distancias grandes de disparo, a pesar de favorecer la dispersión de las partículas, también se pueda afectar la capacidad de penetración de las células en detrimento de la cantidad de células transformadas.

4.1.5. Determinación de la expresión transitoria

Tal como se mencionó en secciones precedentes, las suspensiones celulares de los tratamientos 7 y 23 (Fig. 5, Anexo 6) expresaron la mayor reacción al agente revelador (X-Gluc) de la expresión transitoria de la β -glucuronidasa (GUS), después de 48 horas del bombardeo. Resultados similares fueron obtenidos en otros cultivares de *Musa* (*cv* Bluggoe) por Sagi *et al.* (1995a; 1995b). No obstante, para otras especies la máxima expresión del gen GUS se logró con periodos más cortos después del bombardeo, 24 horas en *Pinus taeda* (Stomp *et al.* 1991) o más largos, 3 días en yuca (Schopke *et al.* 1996).

La observación microscópica de las células bombardeadas (Fig.6) reveló que la mayoría de los agregados celulares que dieron positivo al gen GUS (Fig.6a), expresan este gen en la totalidad de la masa celular (Fig.6b). Como puede observarse, la tinción es muy fuerte, significando que el evento de transformación fue bastante exitoso. Además se observó que aún después del proceso de división celular las células hijas continúan expresando la coloración azul que caracteriza la presencia del gen. Alrededor de estos agregados celulares también se observan células translúcidas, sin coloración, las cuales evidentemente no son portadoras del gen GUS (Fig.6c).

El estudio histológico confirma estas observaciones y nos revela la presencia del gen GUS tanto en el interior de las células individuales como en los agregados celulares (Fig. 6d). Además se observó que las células que expresan el gen conservan su capacidad de división (Fig.6e). El daño celular también fue observado después del bombardeo en

ambos cultivares mediante la plasmólisis celular y la presencia de núcleos y nucleolos poco diferenciados (Fig. 6f).

Posiblemente las células que no muestran la coloración azul no fueron impactadas por los proyectiles (Fig. 6c). Lo anterior demuestra que es un evento aleatorio donde algunas células pueden no recibir el impacto de los proyectiles y otras pueden ser alcanzadas por más de un proyectil. La presencia de una partícula en el citoplasma no excluye la presencia de una segunda partícula en el núcleo (Hunold *et al.* 1994). Esto puede conducir a la muerte del tejido o bien a la expresión transitoria, tal como ha sido mencionado por otros autores. Esta condición puede inhibir la expresión y provocar el silenciamiento de los genes de interés debido a la inserción de copias múltiples en el genoma, tal como se ha observado en soya (Hadi *et al.* 1996; Fu *et al.* 2000; Matzke *et al.* 1996).

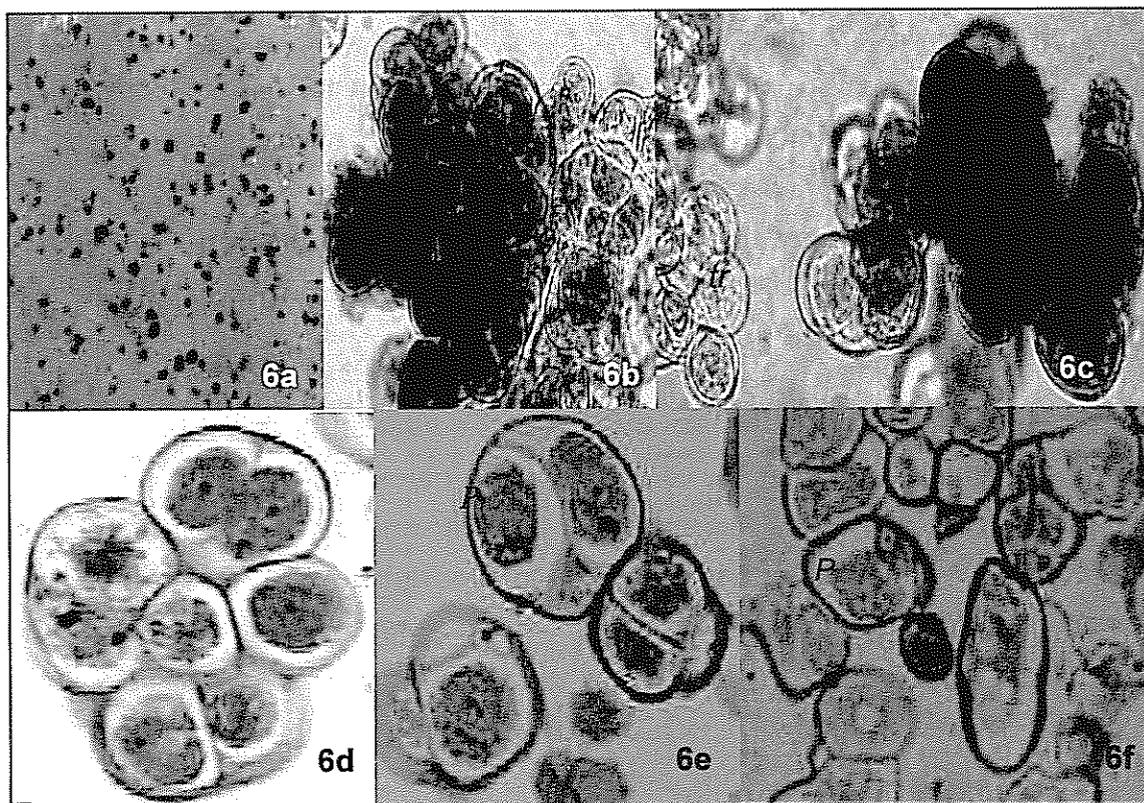


Figura 6. Observaciones microscópicas de los agregados celulares embriogénicos del cv Curraré mostrando la expresión transitoria de la β -glucuronidasa (GUS) después de 48 horas de realizado el bombardeo. **a.** Vista general de la suspensión celular después de 16 horas en presencia de la solución reveladora (4X). **b.** Agregado celular mostrando la tinción total del contenido celular (20X). **c.** Células translúcidas (*tr*) que no expresan el gen GUS (20X). **d.** Presencia del gen GUS en el interior celular (20X). **e.** Células en división (20X). **f.** Daño celular en células de Gran Enano, obsérvese la plasmólisis celular (*p*) y la presencia de núcleos y nucleolos poco diferenciados (20X).

4.1.6. Sensibilidad de las suspensiones celulares o los agentes selectivos higromicina y kanamicina

4.1.6.1. Selección con higromicina (pHAGG)

El estado de desarrollo de las células después de cuatro y ocho semanas de cultivo en presencia del medio con el agente selectivo higromicina, se evaluó mediante el criterio de supervivencia o muerte. La Fig.7 y Anexo 7 muestran los resultados para el cultivar Curraré, en la cual se observan células necrosadas (Fig. 7a) que no soportaron la selección y células que sobrevivieron (Fig. 7b) a la selección con el antibiótico higromicina. Posiblemente, la supervivencia de estas células fue favorecida por el periodo de 10 días que permanecieron en medio de cultivo sin el agente selectivo (higromicina 75 mg/l), después del bombardeo. Periodos de cultivo sin selección han sido utilizados por otros autores (Vain *et al.* 1993; Hadi *et al.* 1996), sin embargo; en ningún caso se mencionan ventajas o desventajas al respecto. El estudio histológico reveló los daños ocasionados a nivel de citoplasma por este agente selectivo, lo cual corresponde a células plasmolizadas, completamente vacuoladas y con núcleos mal definidos (Fig. 7c). No obstante, también se observan grupos de células en división, con núcleos bien definidos, las cuales soportaron el proceso de selección (Fig. 7d). Estas células eventualmente se multiplicaron y continuaron con el proceso de regeneración.

Las células de Curraré de los tratamientos 7, 23, y 19 (Fig. 5, Anexo 6) que sobrevivieron al proceso de selección mostraron mayor tolerancia al antibiótico y después de ocho semanas de estar en el medio de selección (M3 con higromicina 75 mg/l) mostraron la formación de los primeros agregados celulares en crecimiento activo (Fig. 7e). Estos resultados son interesantes debido a que normalmente se utilizan concentraciones de antibiótico inferiores, en rangos de 0 a 50 mg/l. Por ejemplo, Sági *et al.* (1995) demostraron que la higromicina fue el mejor agente selectivo sobre células embriogénicas de banano, después de comparar diferentes concentraciones (0-50 mg/l) y diferentes antibióticos (geniticina, higromicina, kanamicina, neomicina y paramomicina). Sin embargo, encontraron que la concentración de 50mg/l de higromicina inhibió el crecimiento celular, con un incremento en la toxicidad en tiempos prolongados de exposición. No obstante, esa misma concentración resultó muy eficiente para la transformación estable de soja según Vain *et al.* (1993); así como la selección de 75 clones de soja, de acuerdo a Hadi *et al.* (1996).

Los agregados fueron subcultivados nuevamente en el medio de regeneración con selección sobre el cual se reveló la supervivencia mediante un aumento en el grado de desarrollo de las masas proembriónicas, evidenciando la diferenciación de embriones globulares (Fig. 7f).

El análisis histoquímico para evaluar la expresión del gen GUS en estos materiales mostró una intensa y uniforme tinción azul indicando la eficiencia de la expresión del gen en el contenido celular (Fig. 7 g;h).

La evaluación histológica de las masas embriónicas permitió determinar la capacidad de integración del agente revelador (X-Gluc) dentro del tejido celular. Se observó que la mayoría del tejido interno también presentaba la coloración azul (Fig.7i). Asimismo se identificó la presencia de muchos proembriones con gran cantidad de almidón en la periferia de los agregados y núcleos bien definidos en la mayoría de las células, lo que permite suponer un estado de turgencia celular (Fig.7j). También se observó que la mayoría de las células están en división celular activa mostrando muy buen estado de desarrollo. El centro de los agregados esta constituido básicamente por células meristemáticas y se observa gran cantidad de células embriónicas en la parte externa. Se considera que la gran cantidad de almidones que presentan estas células puede ser un indicativo de que las células embrionarias necesitan fuentes energéticas para su desarrollo y conversión en embriones somáticos. Numerosos embriones en diferentes estados de desarrollo fueron observados en el medio de selección con higromicina (Figs. 7 k;l).

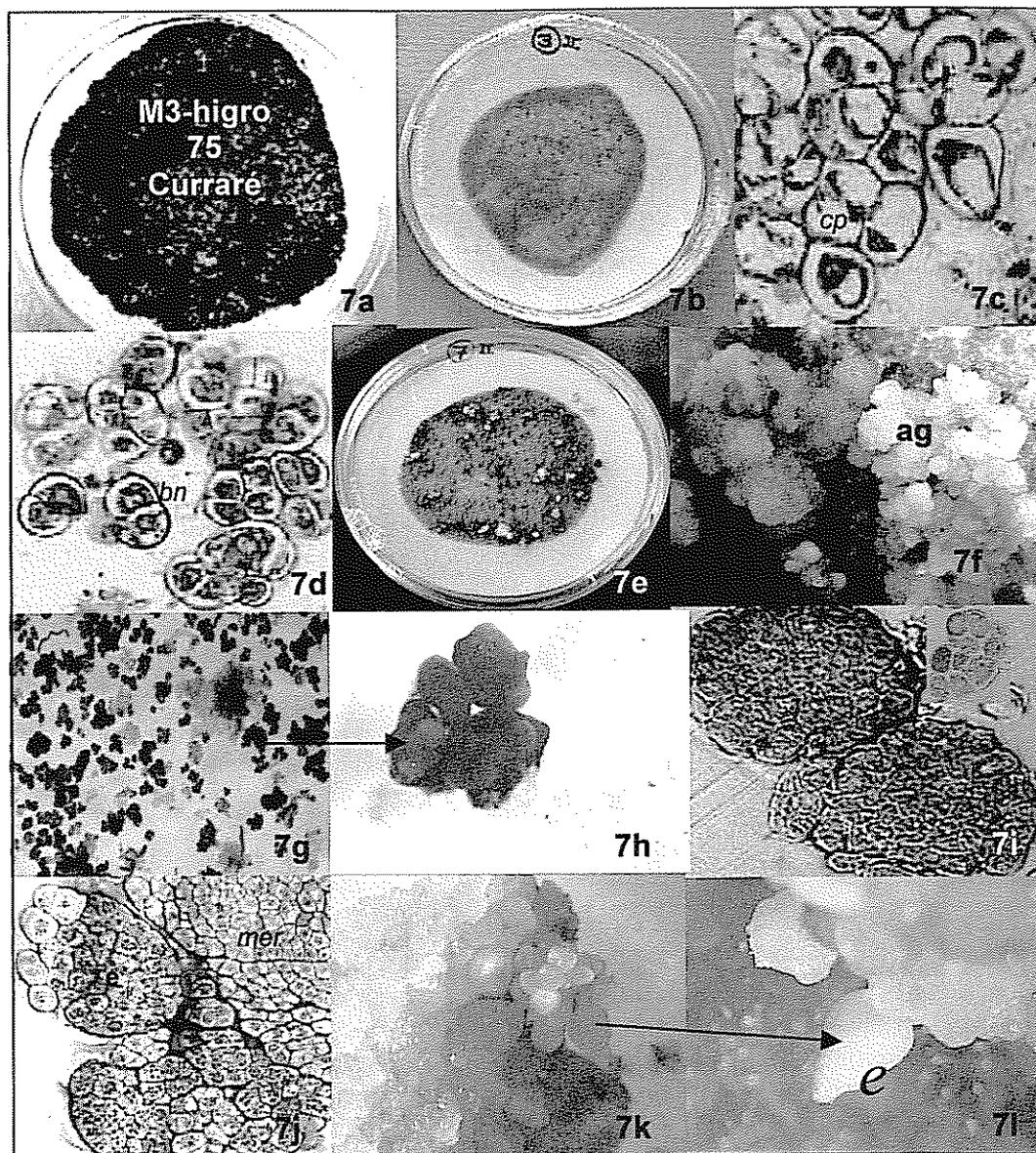


Figura 7. Respuesta de cultivos celulares y embriogénicos del cultivar Curraré al medio de selección (M3 con higromicina 75 mg/l). **a.** Células necrosadas que no soportaron la selección. **b.** Células que sobrevivieron a la selección. **c.** Daños ocasionados por el agente selectivo, células plasmolizadas, completamente vacuoladas y con núcleos mal definidos (X). **d.** Células que soportaron la selección, obsérvese los grupos de células en división y con núcleos bien definidos (X). **e.** Formación de agregados celulares. **f.** Diferenciación de embriones globulares. **g-h.** Coloración azul de la masa celular indicando la expresión del gen GUS. **i.** Histología de la masa celular mostrando la expresión GUS en el tejido interno (X). **j.** Proembriones y células meristemáticas con gran contenido de almidón (X). **k.** Embriones en diferentes estados de desarrollo. **l.** Obsérvese un embrión bien formado (e).

4.1.6.2. Selección con kanamicina (pBI121)

Para el vector de transformación pBI121 la expresión transitoria no fue tan exitosa, por lo tanto, era de esperar que la selección para resistencia al antibiótico kanamicina (M3 con 100mg/l de kanamicina) tampoco fuera exitosa. Efectivamente los resultados de supervivencia y muerte de las células (Anexo 7) después de cuatro semanas de cultivo en el medio con selección mostraron un estado necrótico parcial (Fig.8a), el cual fue uniforme en la mayoría de los tratamientos después de ocho semanas. Para el cultivar Gran Enano el efecto fue mayor (Fig. 8b).

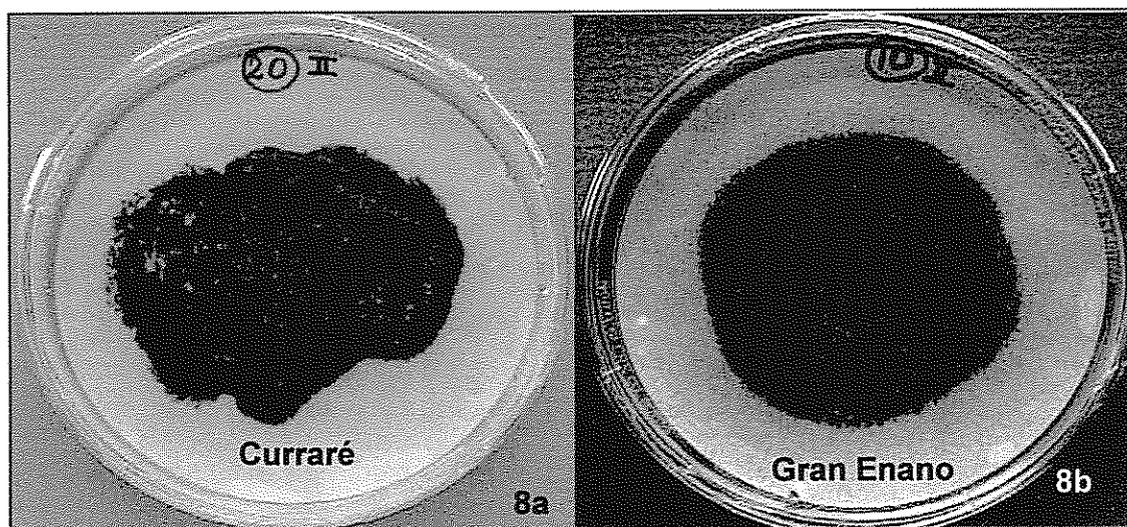


Figura 8. Respuesta de cultivos celulares embriogénicos de los cultivaes Curraré y Gran Enano al medio de selección (M3 con kanamicina 100 mg/l). **a.** Cultivos de Curraré mostrando un estado necrótico parcial. **b.** Cultivos de Gran Enano mostrando un estado necrótico uniforme.

Suponemos que el fracaso obtenido en los eventos de transformación con el plásmido pBI121 puede estar asociado al agente selectivo kanamicina, considerando que los otros parámetros de transformación no fueron modificados. El efecto inhibitorio de la kanamicina ya ha sido mencionado tanto para banano (Becker *et al.* 2000), como para otras especies (Vasil *et al.* 1991; Yao *et al.* 1995).

4.1.7. Germinación y desarrollo de embriones somáticos regenerados en medio con selección

Los agregados celulares de Curraré que lograron superar la etapa de selección en medio M3 (tratamientos 7, 19 y 23) regeneraron en embriones globulares, los cuales se desarrollaron posteriormente en embriones bien diferenciados sobre el medio de germinación M4 (Fig.9a, Anexo 3). Considerando que los embriones regenerados provienen del vector de transformación pHAGG con el agente selectivo para higromicina, se procedió a cultivar estos embriones en el medio M4 de germinación sin el agente selectivo. Esto para evitar que el proceso de germinación de los embriones fuera bloqueado, debido a que el efecto inhibitorio de algunos antibióticos sobre la germinación ya ha sido observado por varios autores (Yao *et al.* 1995; Becker *et al.* 2000).

Una vez lograda la germinación, los embriones se subcultivaron en el medio de desarrollo M5 (Anexo 4) con el respectivo antibiótico. Estos embriones muestran un desarrollo normal con la diferenciación de los primordios foliares (Fig. 9b) y la aparición de las primeras hojas verdes (Fig. 9c). Inicialmente se logró la germinación de 12 embriones (Fig.9d), no obstante que los agregados celulares continúan con el proceso de diferenciación. De igual forma, Sagi *et al.* (1995) lograron regenerar 25 plantas del cultivar Bluggoe bajo la presión de selección del antibiótico higromicina. Todas las plantas dieron positivo al gen GUS y también expresaron el gen *hph* después del análisis de PCR.

Cabe destacar que por primera vez en el cultivar Curraré (AAB) se observó la expresión del gen GUS durante la germinación de embriones somáticos regenerados indirectamente a partir de flores femeninas. Esto dio lugar a plantas en desarrollo que expresan el gen reportero (GUS) en hojas (Fig. 9e) y raíces (Fig.9f). Estas observaciones hacen suponer que después de cinco meses de haber realizado los eventos de transformación tanto la expresión del gen reportero (GUS), como la del gen marcador *hph* para la resistencia a higromicina son estables. En musáceas sólo se ha reportado la expresión estable del gen GUS, utilizando el bombardeo de partículas en los cultivares Williams y Bluggoe (Sagi *et al.*, 1995); Gran Enano (Becker *et al.*; 2000) y en el cultivar AAB "Three Hand Planty" (Remy *et al.*;1998). No obstante, que el mayor número de cultivares ha sido transformado utilizando *A.tumefaciens*, Gran Enano (May *et al.*1995; Hernández *et al.*1999; Moy *et al.*;1998); FHIA 02 (Moy *et al.*1998); Williams, "Three Hand Planty" y FHIA 18 (Pérez *et al.* 1999); y el cultivar AAB "Rasthalí" (Ganapathi *et al.* 1999; 2001a).

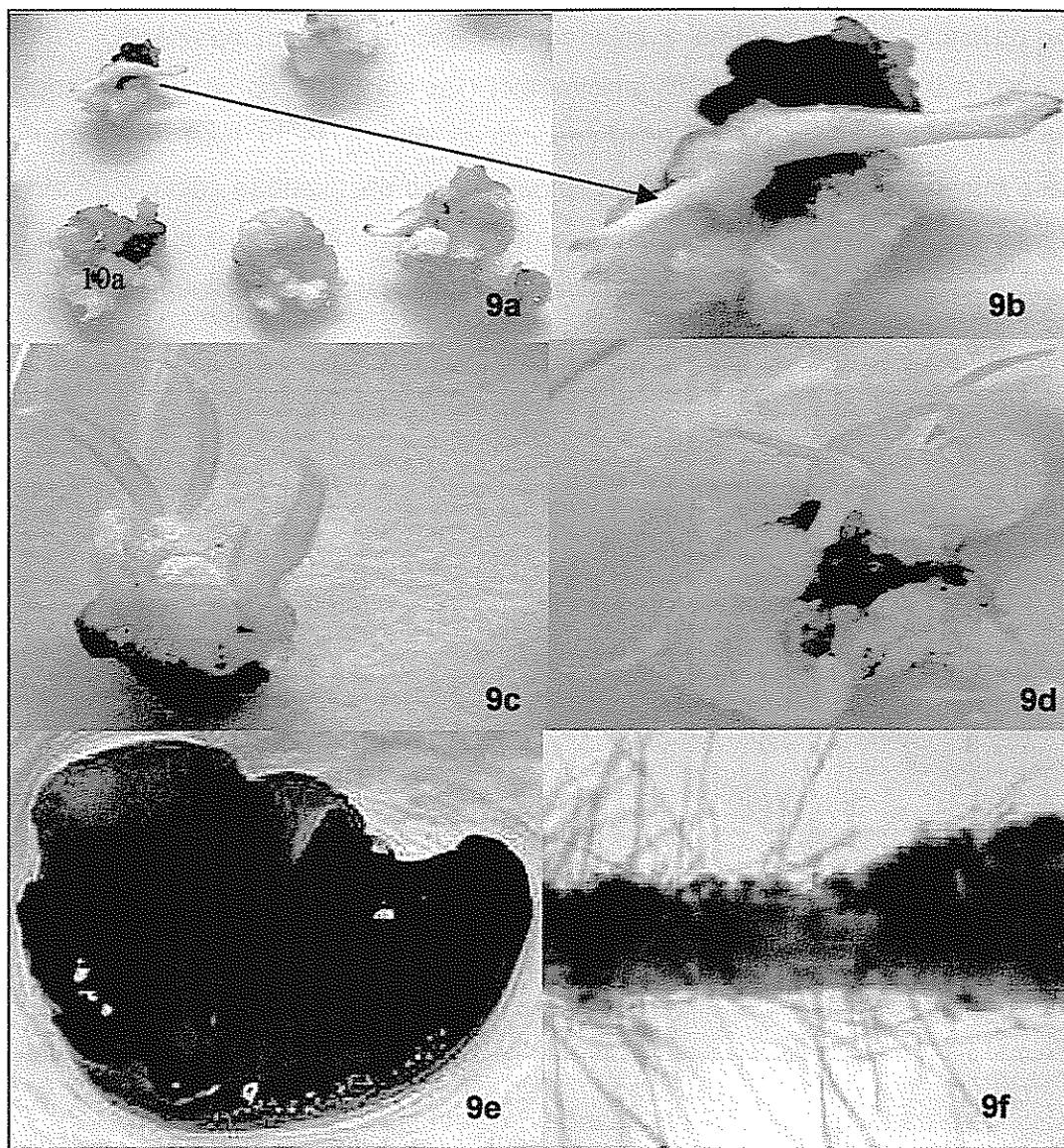


Figura 9. Germinación y desarrollo de embriones somáticos del cv Curraré regenerados en medio de selección (M3 con higromicina 75 mg/l). a. Diferenciación de embriones sobre el medio de germinación M4. b. Embriones mostrando la diferenciación de los primordios foliares. c. Embriones mostrando las primeras hojas verdes. d. Embriones completamente germinados. e. Secciones de hoja de plantas en desarrollo que muestran la presencia del gen GUS. f. Secciones de raíz de plantas en desarrollo mostrando la presencia del gen GUS.

La Figura 10a. muestra las plantas de Curraré en desarrollo sobre el medio M5 con el agente selectivo. Estas plantas no difieren de las obtenidas en el proceso normal de conversión de embrión en planta sin pasar por los eventos de transformación genética (Fig.10b). Obsérvese también embriones normales y embriones que murieron, al ser sometidos al proceso de selección con higromicina 75 mg/l (Fig. 10c). En resultados presentados por Sagi *et al.* (1995) la concentración de 50 mg/l de higromicina fue suficiente para inhibir el desarrollo de las plantas no transformadas. En nuestro caso se podría esperar que concentraciones superiores de higromicina (75mg/l) resultaran letales para las plantas que no integraron el gen de resistencia.

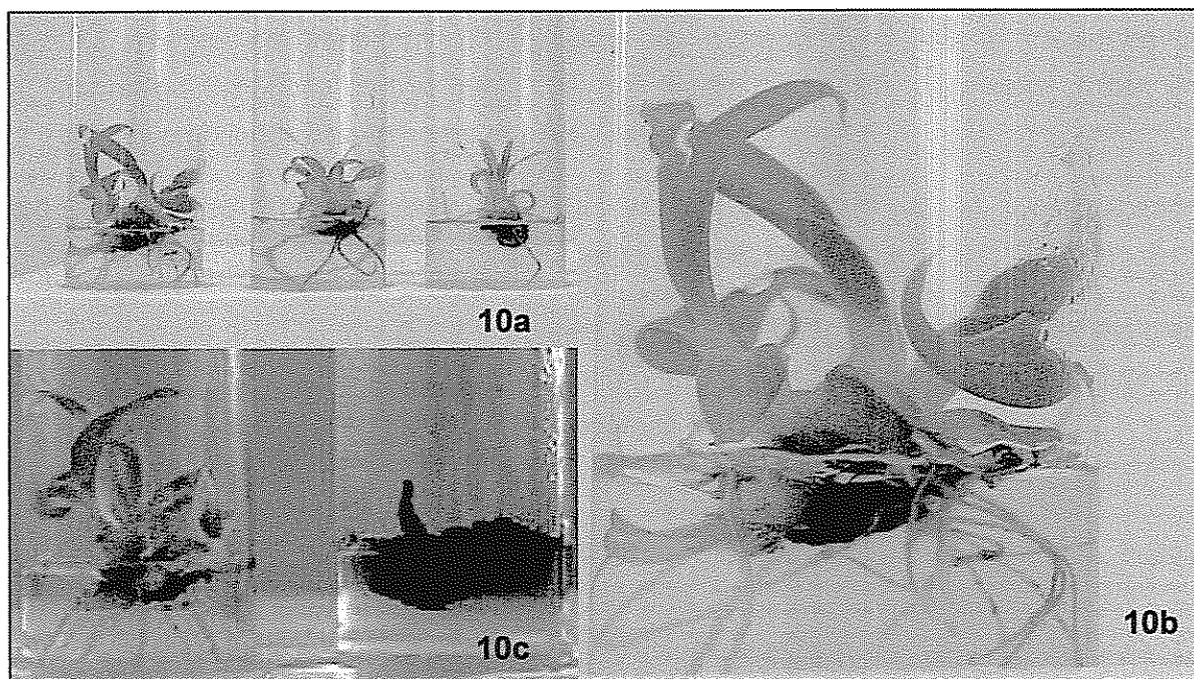


Figura 10. Plantas de Curraré en el medio de desarrollo M5. **a.** Plantas en presencia del agente selectivo. **b.** Plantas que no pasaron por los eventos de transformación genética. **c.** Embriones normales (*en*) y embriones muertos durante la selección (*em*).

Finalmente, cabe destacar que el éxito logrado durante esta investigación estuvo directamente relacionado con la disponibilidad de un eficiente sistema de regeneración celular de banano y plátano, desarrollado en el CATIE, así como, con la experiencia en ingeniería genética aportada por el equipo científico del CINVESTAV de Irapuato, México.

V. CONCLUSIONES

- ⇒ Se lograron establecer las condiciones de bombardeo para la transformación genética de suspensiones celulares de banano y plátano (cv Gran enano y Curraré) en el laboratorio de Biotecnología del CATIE.
- ⇒ Se lograron determinar las condiciones de recuperación de las suspensiones celulares de banano y plátano después de la transformación.
- ⇒ Las partículas de tungsteno fueron más eficientes para la transformación genética de banano y plátano.
- ⇒ Se determinó que las condiciones óptimas de bombardeo fueron 6 cm a 1100 psi.
- ⇒ Los eventos de transformación genética se lograron cuantificar a través de la expresión transitoria con el gen GUS, por medio del conteo de puntos azules en células embriogénicas 48 horas después del bombardeo.
- ⇒ Se demostró la presencia y actividad del gen reportero GUS en los agregados celulares embriogénicos a través de un análisis histoquímico.
- ⇒ El plásmido pHAGG que porta los genes de resistencia al hongo expresó los mejores resultados de transformación genética en el cultivar Curraré (AAB), a nivel de expresión transitoria y de selección comparado con el plásmido pBI121.

Además de cumplir con los objetivos originales, se alcanzó los siguientes logros adicionales:

- ⇒ Se logró la germinación de embriones somáticos en medio M4 y el desarrollo a planta completa en medio M5 con selección (Higromicina 75mg/l) por primera vez en el cultivar Curraré. Además se comprobó la presencia del gen reportero GUS en tejidos de hoja y raíz en las plantas obtenidas.
- ⇒ Las plantas obtenidas serán posteriormente analizadas por métodos moleculares, para confirmar su transformación, y evaluadas en invernadero para su posible resistencia a Sigatoka negra.
- ⇒ Con este trabajo se confirmó los beneficios que aporta el trabajo conjunto entre instituciones al compartir sus fortalezas.

VI. RECOMENDACIONES

- ⇒ Contar con un sistema de regeneración adecuado para lograr recuperar los materiales que serán sometidos al proceso de transformación genética.
- ⇒ Realizar una cinética del crecimiento de las suspensiones celulares para verificar la capacidad de multiplicación de las mismas y el momento adecuado para su uso en transformación.
- ⇒ Verificar mediante el análisis microscópico e histológico la calidad de las células individuales y de los agregados celulares que se utilizarán durante la transformación.
- ⇒ Seleccionar el microproyectil adecuado para cada tipo de material biológico para reducir la pérdida del material bombardeado por algún efecto negativo de la actividad celular.
- ⇒ Preparar los microproyectiles justo antes de iniciar con el proceso de transformación para evitar cambios en las partículas que puedan interferir negativamente al momento de realizar los disparos, especialmente cuando se utiliza oro.
- ⇒ Realizar análisis histoquímicos en las etapas posteriores al bombardeo para asegurar el éxito de la transformación genética a nivel del gen reportero.
- ⇒ Mantener en todo momento el material vegetal bajo presión de selección con el agente selectivo adecuado.
- ⇒ Continuar los trabajos en transformación genética en diferentes cultivares de *Musa* sp mediante la técnica de bombardeo de partículas, asimismo, iniciar y comparar la eficiencia de este sistema con respecto al uso de *Agrobacterium*.

VII. LITERATURA CITADA

- Becker, D; Kemper, E; Schell, J; Masterson, R. 1992. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* 20:1195-1197
- Becker, DK; Bugdale, B; Smith, MK; Harding, RM; Dale, JL. 2000. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa spp.* AAA group) cv 'Gran Nain' via microprojectile bombardment. *Plant Cell Report* 19:229-234.
- Belalcazar, S; Salazar, F; Valencia, JA; Silva, CH; Arcila, MI; Jaramillo, R. 1995. Reacción de variedades mejoradas al ataque de sigatoka negra. *In: Mejoramiento de la producción del cultivo del plátano. ICA Comité de Cafeteros del Quindío-Corpoica-CIID (IDRC)INIBAP-Inpofos (eds). Produmedios. Quindío Armenia, CO. p.192-214.*
- Bieberach, FCY. 1995. Embriogenesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa sp.* Tesis Mag Sc. Turrialba, CR, CATIE. 86p.
- Birch, RG. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. Biol.* 48:297-326. Annual Review of plant physiology and plant molecular biology.
- Bretagnesagnard, B; Chupeau, Y. 1996. Selection of transgenic flax plants facilitated by spectinomycin. *Transgen Res* 5:131-380.
- Brunner, F; Stintzi, A; Friting, B; Legran, M. 1998. Substrate specificities of tobacco chitinases. *The Plant Journal* 13(2): 225-234.
- Cammue, BPA; De Bolle, MFC; Terras; FRG; Proost, P; van Dame, J; Rees, SB; Vanderleyden, J; Broekaert, WF. 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* seeds. *Journal of Biological Chemistry.* 267:2228-2233.
- Carlier, J; Fouré, E; Gauhl, F; Jones, DR; Lepoivre, P; Mourichon, X; Pasberg-Gauhl, C; Romero, RA. 2000. Fungal diseases of the foliage. *In Jones, D.R. ed. Diseases of banana, abacá and Enset. Oxon, UK. CABI Publishing. p. 37-141.*
- Castaneda, D; Díaz, T; Arango, R. 2000. *In vitro* activity of tobacco class 1 chitinase and beta 1-3 glucanase against *M. fijiensis* and their interaction with the chemical fungicides. *MUSARAMA* 13(1): 30.
- Christou, P. 1993. Particle gun mediated transformation. *Biotechnology* 4:135-141.
- Collinge, DB; Kragh, KM; Mikkelsen, JD; Nielsen, KK; Rasmussen, U; Vad, K. 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal* 3(1): 31-40.
- Côte, FX, Domergue, R; Monmarson, S; Schwendiman, J; Tesson, C; Escalant, JV. 1996. Embriogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grande naine. *Physiology Plantarum* 97: 258-290.

- Cronauer, SS; Krikorian, AD. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Reports* 7:23-25.
- Crouch, HJ; Vuylsteke, D; Ortiz, R. 1998. Perspectives on application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa spp*). *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol 1.
- Cruz, HA. 1998. Producción de embriones somáticos transformados de mango y aguacate. Tesis Ph.D. Irapuato, Guanajuato, MX, CINVESTAV. 80p.
- Dale, JL. 1999. Banana biotechnology: already a reality (en línea). *AgBiotechNet* 1:1-6. Consultado 12 noviembre. 2001. Disponible en <http://www.agbiotech.net>
- De Oliveira, S; de Mello, S; Gasparotto, L; Pires de Matos, A; Cordeiro, M; Boher, B. 2000. Evaluación de *Musa spp*. para la resistencia a la enfermedad de moko (*Raltonia solanacearum*, raza 2). *Infomusa* 9(1):19-20.
- Dhed'A, D; Dumortier, F; Panis, B; Vuylsteke, D; De Langhe, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bloggoe' (*Musa spp*. ABB group). *Fruits* 46(2): 125-135.
- Escalant, JV; Ortiz, JL; Pérez, L. 1994b. Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de flores masculinas de los cultivares triploides de banano y plátano. *In* CATIE (Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza). Programa de Agricultura Tropical Sostenible. Area de Cultivos Tropicales. Biotecnología. Informe anual para 1993. Turrialba, CR.
- Escalant, JV; Teisson, C. 1988. Embryogenese somatique chez *Musa sp*. *CR. Acad. Sci. Paris* 306(3):277-281.
- Escalant, JV; Teisson, C. 1989. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports* 7:665-668.
- Escalant, JV; Teisson, C; Côte, F. 1994a. Amplified somatic embryogenesis from male flower of Triploid Banana and Plantain Cultivars (*Musa spp*). *In vitro cell. Dev. Biol.* 30: 181-186.
- Etienne, H; Bertrand, B; Anthony, F; Côte, F; Berthouly, M. 1997. L'embryogenèse somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier. *In: ASIC, 17° colloque, Nairobi* p 457-465.
- Finer, JJ; Vain, P; Jones, MW; McMullen, DM. 1992. Development of the particle inflow gun for ADN delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* 11:323-328.
- Frisch, DA; Harris-Haller, L; Yokubaitis, NT; Thomas, TL; Hardin, SH; Hall, TC. 1995. Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Molecular Biology* 27:405-409.
- Frison, E; Sharrock, S. 1998. The economic, social and nutritional of banana in the world. *In* Bananas and Food Security. Les productions bananières: un enjeu économique majeur pour la sécurité alimentaire. Douala, Cameroon. INIBAP. 21-35p.

- Fu, X; Duc, LT; Fontana, S; Bong, BB; Tinjuangjun, P; Sudhkar, D; Twyman, RM; Christou, P; Kohli, A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* 9:11-19.
- Ganapathi, TR; Higgs, N; Van Eck, J; Balint-Kurti, PJ; May, GD. 1999. Transformación y regeneración del cultivar de banano Rasthali (AAB). *INFOMUSA* 8(1):13. Solo resumen.
- Ganapathi, TR; Higgs, N; Van Eck, J; Balint-Kurti, PJ; May, GD. 2001a. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of bannana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Reports* 20:157-162
- Ganapathi, TR; Suprasanna, P; Kulkarni, VM; Chakrabarti, A; Bapat, VA. 2001b. Enfoques biotecnológicos hacia el mejoramiento de bananos. *INFOMUSA* 10(1):7. Solo resumen.
- Georget, F; Domergue, R; Ferrière, N; Côte, FX. 2000. Morphohistological study of the different constituents of a bannana (*Musa* AAA, CV. Grain naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports* 19:748-754.
- Gómez Kosky, R; Gilliard, T; Barranco, LA; Reyes, M. 2000. Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB). *INFOMUSA* 9(1):12-16.
- Gowen, A; Queneherve, P. 1990. Nemátode parasites of bananas, plantain and abaca. In: *Plant Parasitic Nematodes* In Ed. Luc, M; Sikora, RA; Bridge JL. Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, p. 431-460.
- Grapin, A; Ortiz, JL; Domergue, R; Babeau, J; Monmarson, J; Escalant, JV; Teisson, C; Côte, F. 1998. Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flowers of *Musa*. *INFOMUSA* 7(1):13-15.
- Grapin, A; Ortiz, JL; Lescot, T; Ferrière; Côte, F. 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 61:237-244.
- Grapin, A; Schwendiman, J; Teisson, C. 1996. Somatic Embriogenesis in Plantain Banana. *In Vitro Cell Development Biology-Plant* 32:66-71.
- Hadi, MZ; McMullen, MD; Finer, JJ. 1996. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 15:500-505.
- Hamberlant, G. 1902. Experiments on the culture of isolated plant cell. In: Perseley, GJ; De Langhe, EA. (eds). *Banana and Plantain Breeding Strategies*. Proceedings of an International workshop. 13-17 Oct. 1986. AU. 69-85p.
- Henriquez, W., Jeffers, RD., Laccher, TE., Kendall, R.J. 1997. Agrochemical use on banana plantations in Latin América: perspectives on ecological risk. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16:91-99.

- Hunold, R; Bronner, R; Hahne, G. 1994. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *The Plant Journal* 5(4):593-604.
- Jones, DR. 2000. Introduction to banana, abacá and enset. *In* Jones. Diseases of Banana, Abacá and Enset. 544p.
- Lupotto, E; Reali, A; Passera, S; Chan, MT. 1999. Maize elite inbred lines susceptible to *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Maydica*. 44(3):211-218.
- Ma, SS. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture in banana. *In* Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops. Taipei, Taiwan held in 8-9th march, 1988. National Taiwan University. 181-188p.
- Mabambo, KN; Gauhl, F; Vuylsteke, D; Ortiz, R; Pasberg-Gauhl, C; Swennen, R. 1993. Yield loss in plantain from black sigatoka leaf spot and field performance of resistant hybrids. *Field Crops Research* 35:35-42.
- Marroquin, CG; Paduscheck, C; Escalant, JV; Teisson, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro Cellular. Deversity. Biology*. 29:43-46.
- Matzke, MA; Matzke, AJM; Eggleston, WB. 1996. Paramutation and transgene silencing: A common response to invasive ADN. *Trends Plant Sci*. 1:382-388.
- May, CD; Mason, H; Wiecko, A; Novak, FJ; Amtzen, CJ. 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium* mediated transformation. *Bio Technology* 13:486-492.
- Meins, F; Neuhaus, JM; Sperinsen, C; Ryals, J. 1992. The primary structure of plant pathogenesis related glucanohydrolases and their genes. *In* Genes Involved in Plant Defense. Wien-New York. p. 245-282.
- Moy, TS; Hanson, B; Gutterson, N; Palmer, KE. 1998. Development of an efficient banana transformation method and the analysis of the expression of some constitutive promoters in young transgenic plants. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. *Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21 st Century*.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. (DM) 15:473-497
- Novak, FJ. 1992. *Musa* (bananas and plantain). *In* Hammerschlag, FA, Litz, RE. (eds *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*) 449-448. Cab International, Walling ford. ISBN 0-851-98708-7.
- Novak, FJ; Afza, R.; Van Duren, M; Perea-Dallos, M; Conger, BV; Xiaolang, T. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspensioncultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) BANANAS (*Musa spp.*). *Bio/Tech*. 7:154-159.
- Nowakunda, K; Rubaihayo, PR; Ameny, MA; Tushemereirwe. 2000. Aceptabilidad por parte de consumidores en Uganda de bananos introducidos. *INFOMUSA* 9:22-25.

- Padmanaban, B; Sundararaju, P; Velayudhan, KC; Sathiamoorthy, S. 2001. Evaluación del germoplasma de *Musa* contra los picudos negros del banano. *INFOMUSA* 10(1):26-28.
- Parrot, W. 1993. Cell culture techniques. *In* Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP (1992, San José, C.R.). pag.
- Pérez Hernández, JB; Swennen, R; Galán Saúco, V; Sági, L. 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of banana embryogenic cell suspension cultures. *INFOMUSA* 8(1):13. Solo resumen.
- Pérez, HJB; Swennen, R; Galán, SV; Sági, L. 1999. Transformación mediante *Agrobacterium* de los cultivos de suspensiones de células embriogénicas de banano. *INFOMUSA* 8(1): 13. Solo resumen.
- Ploetz, R.C; Pegg, K.C. 2000. Fungal Diseases of the root, corm and pseudostem. *Fusarium* wilt. *In* Jones, DR. eds. Diseases of Banana, Abacá and Enset. CABI Publishing. Oxon, UK. p. 465-159.
- Potrykus, I; Bilang, R; Fütterer, J; Sauter, C; Schrott, M; Spangenberg, G. 1998. Genetic engineering of crop plants. *In* Altman, A. (ed.). Agricultural Biotechnology.
- Potrykus. 1991. Gene transfer to plants Assessment of Publisher Approaches and Results. *Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 4:205-225.
- PROMUSA. 2000. Acta de la segunda reunión del Comité Asesor de PROMUSA Bangkok, Tailandia. PROMUSA I-XVI. *In* *INFOMUSA* 9(2):22-25 Bangkok.
- Remy, S; François, I; Cammue, BPA; Swennen, R; Sági, L. 1998. Co-transformación as a potential tool to create multiple and durable resistance in banana (*Musa spp.*). *Acta Horticulturae* 461. p 361-365
- Rhodes, PL. 1964. A new banana disease in Fiji. *Commonw. Phytopathol. News* 10:31-41.
- Rosales, LS. 1994. Cultivo de callos en suspensión. *In* Cultivo de tejidos vegetales. México. 122-132p.
- Rowe, P. 1985. Mejoramiento de bananos y plátanos. UPEB. Centro de informaciones y documentación. 19p
- Russell Kikkert, J. 1993. The biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33:221-226.
- Russell, JA; Roy, MK; Sanford, JC. 1992. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiology* 98:1050.
- Sági, L. 2000. Genetic engineering of banana for disease resistance – future possibilites. fungal diseases of the foliage. *In* Diseases of Banana, Abacá and Enset. CABI. Oxon, UK. Publishing. p. 465-515.

- Sági, L; DeMay, G, Demy, S; Swennen, R; 1998. Recent developments in biotechnological research on bananas (*Musa spp.*). *Biotechnology and genetic Engineering Reviews*. Vol 15:312-327.
- Sági, L; Panis, B; Remy, S., Schoofs, H; De Smet, K; Swennen, R; Cammue, BPA. 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via particle bombardment. *Bio/Technology*. 13:481-485.
- Sági, L; Remy, S; Panis, B; Swennen, R; Volckaert, G. 1994. Transient gene expression in electroporated banana protoplasts (*Musa spp.*, cv. 'Bluggoe' ABB group). *Plant Cell Reports* 13:262-266.
- Sanford, JC; Klein, TH; Wolf, E; Allen, N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5:27-37.
- Sanford, JC; Smith, FD; Russell, A. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth. Enzymol* 217:483-509.
- Sarah, JL. 2000. Nematode pathogens. Borrowing nematode. *In Diseases of Banana, Abacá and Enset*. CABI. Oxon, UK. Publishing. p. 295-303.
- Schoofs, H; Panis, B; Cammue, B; Sági, L; Swennen, R. 1995. *Musa* embryogenic cell suspensions and its applications: recent advances. *In Simposio CIRAD/CATIE Mejoramiento genético y desarrollo de los cultivos tropicales*. p 62-63.
- Schöpke, C; Taylor, N; Cárcamo, R; Konan, K; Marmey, P; Henshaw, GG; Beachy, RN; Fauquet, C. 1996. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. *Nature Biotechnology* 14:731-735.
- Sela-Buurlage, MB; Ponstein, AS; Bres-vloemans, SA; Melchers, LS; van den Elzen, PJM; Cornelissen, BJC. 1993. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant physiology* 101: 857-863.
- Shewry, PR; Lucas, JA. 1997. Plant Proteins that Confer Resistance to Pest and Pathogens. *Advance Botany and Research*. 26:135-192.
- Simmonds, NW; Weatherup, STC. 1990. Numerical taxonomy of the wild bananas. *New Phytol*. 115:567-571.
- Simmons, CR. 1994. The Physiology and Molecular Biology of Plant 1,3- β -D Glucanases and 1,3; 1,4- β - β -Glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci*. 13(4):325-387.
- Soto, M. 1992. Bananos: cultivo y comercialización. 2 ed. San José, Costa Rica. Litografía e Imprenta Lil. 627p
- Stoger, E; Williams, S; Keen, D; Christou, P. 1998. Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expresion. *Transgen Res*. 7:463-471
- Stomp, AM; Weissinger, A; Sederoff, RR. 1991. Transient expression from microprojectile-mediated ADN transfer in *Pinus taeda*. *Plant Cell Reports* 10:187-190.

- Stover, RH. 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantain. In Krigsvold, DT., Woods, TL. eds. Proceeding of the Sigatoka Workshop. 18-19 Feb. 1980, La Lima, Honduras. United Fruit Company. p 1-18.
- Stover, RH. 1983. Effet du *Cercospora* noir sur les plantains en Amérique Centrale. *Fruits* 38, 326-329.
- Stover, RH; Dickinson, JD. 1976. Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var. *Difformis*: a comparison of the Central American epidemics. *FAO Plant Proteccions Bulletin* 24, 36-42.
- Stover, RH; Simmonds, NW. 1989. Bananas. 3 ed. Longman, Singapore Publishers. 468p.
- Strobel, GA; Stierle, AA; Upadhyaya, R; Hershenhom; Molina, G. 1993. The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease and their potencial use in screening for disease resistance. *In Proceedings of the Workshop on Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement*, San Jose CR 27-31 January.
- Szabados, L; Mroginski, LA; Roca, WM. 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. *In Roca, WM; Mroginski, LA. (eds). Cultivo de Tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. 172-208p.*
- Teisson, C; Alvard, D; Berthouly, M; Côte, F; Escalant, JV; Etienne, H. 1995. *In vitro* culture by temporary immersion: a new device. *Plantations, recherche, developpement* 5:29-34.
- Thomas, JE; Gambley, CF; Geering, ADW; McMichael, LA; Prry, JN; Sharman, M. 2001. Virus y germoplasma de *Musa*. *Infomusa* 10(1):9. Solo resumen.
- Thwaites, SJ; Green, E; Black, R. 2000. Diseases caused by bacteria. Vascular wilt diseases. *In Jones, DR. eds. Diseases of Banana, Abacá and Enset. Oxon, UK. CABI Publishing. p. 213-221.*
- Vain, P; McMullen, M; Finer, J.J. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12:84-88.
- Vasil, V; Brown, SM; Re, D; Fromm, ME; Vasil, IK. 1991. Stably transformed callus from microprojectile bombardment of cell suspension culture of wheat. *Biotechnology* 9.
- Villalobos, V; Thorpe, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In W.M. Roca, L.A. Mroginski eds. Cultivo de tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. CIAT. 127-141p.*
- Vuylsteke, D; Hartman, J; Tenkouano, A. 1999. Breeders' perspective on biotechnology for *Musa* improvement. *INFOMUSA* 8(1):6-7. Solo resumen.
- Walden, R; Wingender, R. 1995. Gene transfer and plant regeneration techniques. *TIBTECH*. 3:324-331.

- Wang, YC; Klein, TC; Fromm, J; Cao, J; Sanford, JC; Wu, R. 1988. Transient expresion of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Molec. Biol.* 11:433-439.
- Wesseling, C; Ahlbon, A; Antich, D; Rodríguez, AC; Castro, R. 1996. Cáncer in banana plantation workers in Costa Rica. *International Journal of Epidemiology.* 25(6): 1125-1131.
- Wessels, JGH; Sietsma, JH. 1981. Fungal cell walls: a survey. *In* Tanner, W; Loewus, FA, eds, *Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Vol 13B: Plant Carbohydrates.* Springer, Berlin, DE. 352-394p.
- Williams, EG; Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57:443-462.
- Yabuuchi, E; Kosako, Y; Yano, I; Hotta, H; Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to *Ralstonia* Gen. Nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov. *Microbiology and Immunology* 39:897-904.
- Yao, JL; Cohen, D; Atkinson, R; Richardson, K; Morris; B. 1995. Regeneration of plants from the commercial apple cultivar 'Royal Gala'. *Plant Cell Rep* 14:407-412.
- Zhu, Q; Maher, EA; Masouds, S; Dixon RA; Lamb, CJ. 1994. Enhanced Protection Against Fungal Attack by Constitutive Co-expression of Chitinase and Glucanase Genes in Transgenic Tobacco. *Biotechnology* 12:807-812.
- Zupan JR; Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107:1041-1047
- Zupan, J; Zambryski, P. 1997. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *Crit. Rev. Plant Science* 16(3):279-295.

VIII. ANEXOS

Anexo 1 Medio de multiplicación M2

Macro y microelementos de MS (Murashige y Skoog 1962), biotina 1mg/l, glutamina 100mg/l, extracto de malta 100mg/l, 2,4-D 1mg/l y sacarosa 45 g/l. El medio es ajustado a un pH:5.3.

Anexo 2. Medio de regeneración M3

Sales inorgánicas	Concentración (mg/l)
KNO ₃	2500
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200
MgSO ₄ · 7H ₂ O	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
MnSO ₄ · H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1
KI	1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1
Fuente de hierro	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15
Na ₂ EDTA	20
Vitaminas de MS	
Biotina	1
Glutamina	100
Extracto de malta	100
Prolina	230.2
ANA	0.2
Zeatina	0.05
2iP	0.2
Kinetina	0.1
Lactosa	10 g/l
Sacarosa	45 g/l
Agarosa	7 g/l
PH	5.3

Anexo 3. Medio de cultivo M4

Macro y microelementos de MS (Murashige y Skoog 1962), vitaminas MS, BAP 0.5 mg/l, AIA 2 mg/l, y sacarosa 30 g/l. El medio es ajustado a un pH:5.8. Gelrite 4 g/l.

Anexo 4. Medio de cultivo M5

Macro y microelementos de MS (Murashige y Skoog 1962), vitaminas MS, y sacarosa 30 g/l. El medio es ajustado a un pH:5.8. Gelrite 2 g/l.

Anexo 5. Buffer de expresión transitoria (GUS).

Preparar tampom "Buffer" fosfato 50 mM a pH 7:

A = 100 ml de NaH_2PO_4 a 0.2 M (2.76 g en 100 ml de agua).

B = 200 ml de Na_2HPO_4 a 0.2 M (5.68 g en 200 ml de agua).

Mezclar 100 ml de A con 156.4 ml de B = Buffer fosfato.

Preparar

Triton X 100 al 10%.

Cloranfenicol 50 mg/ml

Preparar 50 ml del revelador para el gen GUS

Tomar 13 ml de la solución Buffer fosfato

0.5 ml de Tritón X 100 al 10%

37 ml de H_2O

50 mg del reactivo 5-Bromo-4-chloro-3-indlyl-beta D-glucuronide acid cyclohexylammonium salt (X-Gluc) 2mM (disolver en DMSO).

50 μl de cloranfenicol (50 mg/ml).

Mezclar y filtrarlo con filtros milliporo 0.22 μm y luego agregarle 10 ml de metanol.

Dejar en contacto la solución reveladora GUS con el tejido transformado por 24 horas a 37°C.

Anexo 6. Cuadro 2. Resultados de la cuantificación de los puntos azules en la expresión transitoria, respecto a los tratamientos.

Presión (psi)	Distancias de disparo (cm)	Microproyectil	Cultivar (cv)	Plásmido	Promedio puntos azules	Tratamiento ¹
1100	6	Oro	Gran Enano	pHAGG pBI121	794 77	1 abc 2 abc
			Curraré	pHAGG pBI121	1596 194	3 ab 4 abc
		Tungsteno	Gran Enano	pHAGG pBI121	407 74	5 abc 6 abc
			Curraré	pHAGG pBI121	2207 83	7 a 8 abc
	9	Oro	Gran Enano	pHAGG pBI121	159 215	9 abc 10 abc
			Curraré	pHAGG pBI121	1116 59	11 abc 12 abc
		Tungsteno	Gran Enano	pHAGG pBI121	180 73	13 abc 14 abc
			Curraré	pHAGG pBI121	317 4	15 abc 16 c
1350	6	Oro	Gran Enano	pHAGG pBI121	396 114	17 abc 18 abc
			Curraré	pHAGG pBI121	1234 139	19 abc 20 abc
		Tungsteno	Gran Enano	pHAGG pBI121	965 148	21 abc 22 abc
			Curraré	pHAGG pBI121	1692 40	23 a 24 abc
	9	Oro	Gran Enano	pHAGG pBI121	225 342	25 abc 26 abc
			Curraré	pHAGG pBI121	145 18	27 abc 28 abc
		Tungsteno	Gran Enano	pHAGG pBI121	148 61	29 abc 30 abc
			Curraré	pHAGG pBI121	208 7	31 abc 32 c

¹ Las medias con la misma letra no difieren ($p \leq 0,05$), según la prueba de tukey.

Anexo 7. Cuadro de sobrevivencia y muerte de las células después de permanecer 60 y 90 días en medio M3 con 75 mg/l higromicina

Tratamiento ¹	Sobrevivencia		Muerte	
	30 días	60 días	30 días	60 días
1	++	0	+	+++
2	++	0	+	+++
3	+++	0	0	+++
4	+++	0	0	+++
5	++	0	+	+++
6	++	0	+	+++
7	+++	++	0	+
8	+++	0	0	+++
9	++	0	+	+++
10	+	0	++	+++
11	+++	0	0	+++
12	+++	0	0	+++
13	+++	0	0	+++
14	0	0	+++	+++
15	++	0	+	+++
16	+++	0	0	+++
17	++	0	+	+++
18	0	0	+++	+++
19	++	+	+	++
20	+++	0	0	+++
21	++	0	+	+++
22	+	0	++	+++
23	++	++	+	+
24	++	0	+	+++
25	+	0	++	+++
26	++	0	+	+++
27	+++	0	0	+++
28	+++	0	0	+++
29	++	0	+	+++
30	++	0	+	+++
31	+++	0	0	+++
32	+++	0	0	+++
Cu	+++	+++	0	0
GE	+++	+	0	++

¹ Tratamientos con las misma letra no difieren entre sí ($p \leq 0,05$), según la prueba de tukey.

pHAGG = tratamientos impares

pBI121 = tratamientos pares

Anexo 8. Análisis del diseño estadístico y sus interacciones.

F.variación	GL	Tipo III SS	Cuadrado medio	Valor F	Pr >F
A	1	0.2678788	0.2678788	0.09	0.7677
B	1	22.2024670	22.2024670	7.29	0.0088
C	1	0.1606869	0.1606869	0.05	0.8190
D	1	6.6870953	6.6870953	2.20	0.1432
E	1	116.1836417	116.1836417	38.16	<.0001
A*B	1	0.2061170	0.2061170	0.07	0.7956
A*C	1	0.6624070	0.6624070	0.22	0.6425
A*D	1	5.3114604	5.3114604	1.74	0.1913
A*E	1	0.2288345	0.2288345	0.08	0.7848
B*C	1	9.0082608	9.0082608	2.96	0.0902
B*D	1	9.3706597	9.3706597	3.08	0.0842
B*E	1	1.4426597	1.4426597	0.47	0.4937
C*D	1	1.0147383	1.0147383	0.33	0.5657
C*E	1	3.7980757	3.7980757	1.25	0.2682
D*E	1	25.9284364	25.9284364	8.52	0.0049
A*B*C	1	0.6646436	0.6646436	0.22	0.6419
A*B*D	1	0.7359177	0.7359177	0.24	0.6247
A*B*E	1	0.6274287	0.6274287	0.21	0.6514
A*C*D	1	1.8482926	1.8482926	0.61	0.4388
A*C*E	1	0.7429698	0.7429698	0.24	0.6230
A*D*E	1	0.1715479	0.1715479	0.06	0.8131
B*C*D	1	1.6991185	1.6991185	0.56	0.4578
B*C*E	1	0.8774320	0.8774320	0.29	0.5932
B*D*E	1	3.9187356	3.9187356	1.29	0.2608
C*D*E	1	1.6673081	1.6673081	0.55	0.4620
A*B*C*D	1	0.0002473	0.0002473	0.00	0.9928
A*B*C*E	1	2.8145569	2.8145569	0.92	0.3399
A*C*D*E	1	0.0260148	0.0260148	0.01	0.9266
B*C*D*E	1	0.1290831	0.1290831	0.04	0.8375
A*B*C*D*E	2	0.6380376	0.3190188	0.10	0.9007

A = Presión (1100 y 1350 psi)
 B = Distancia de disparo (6 y 9 cm)
 C = Microproyectil (oro y tungsteno)
 D = Cultivar (Gran Enano y Curraré)
 E = Vector de transformación (pHAGG y pBI121)

Resultados del PROC GLM.

Fuente Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
Tratamiento	31	219.03	7.066	2.32	0.0023
Error	64	194.85	3.044		
Total	95	413.89			