

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE ENSEÑANZA  
AREA DE POSGRADO

**EMBRIOGENESIS SOMATICA Y REGENERACION DE PLANTAS EN  
CULTIVARES DE *Musa* sp.**

POR

**CARMEN YVONNE BIEBERACH FORERO**

Turrialba, Costa Rica

1995

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE ENSEÑANZA  
ÁREA DE POSGRADO

**EMBRIÓGENESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS EN  
CULTIVARES DE *Musa* sp.**

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico de Posgrado y Capacitación del Programa de Enseñanza en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

*Magister Scientiae*

por

**CARMEN YVONNE BIEBERACH FORERO**


Turrialba, Costa Rica


1995

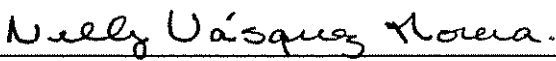
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agricolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

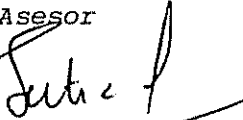
MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

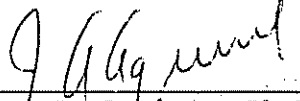
  
\_\_\_\_\_  
Jean Vincent Escalant, Ph.D  
Profesor Consejero


  
\_\_\_\_\_  
Magali Dufour, Ph.D  
Miembro Comité Asesor

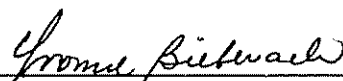
  
\_\_\_\_\_  
Nelly Vásquez, MSc.  
Miembro Comité Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Benoit Bertrand, MSc.  
Miembro Comité Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Ramiro Jaramillo, MSc.  
Miembro Comité Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Juan A. Aguirre, Ph.D  
Jefe, Area de Postgrado

  
\_\_\_\_\_  
Assefaw Tewolde, Ph.D  
Director, Programa de Enseñanza

  
\_\_\_\_\_  
Carmen Yvonne Bieberach Forero  
Candidato

***A Irina Calero Bieberach  
y Fernanda Sebastiana Forero***

## AGRADECIMIENTOS

Al personal de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), por su ayuda desinteresada y aliento permanente durante los dos años de mi permanencia en calidad de Asistente de Investigación y estudiante de Maestría.

A Juan Luis Ortiz, Asesor *ad honores* de mi tesis, por haber compartido conmigo sus conocimientos y ser siempre una bella persona.

A Luis Pérez, quién fue el proveedor de las 'chiras', con lluvia o con sol.

A todos los miembros de mi Comité Asesor por su valioso aporte durante el desarrollo de la investigación y en la redacción de este documento.

A Nelly Vásquez, por su amistad y confianza en mi persona, por su aporte en el desarrollo del estudio histológico de ésta tesis.

A Jean Vincent Escalant, mi Profesor Consejero, por su confianza en mi capacidad y respeto a mi criterio y decisiones, por los conocimientos transmitidos.

A todos mis compañeros de la promoción 1993-94 por haber enriquecido mi vida con todos sus valores y la hermosa experiencia de compartir estos dos años. En especial a Lilliam Adela Rodríguez por dos años de sincera amistad.

A Alberto Sánchez, María del Rosario Jiménez, Mauricio Torres, Isabel Cristina Herrera por todos los recuerdos y su amistad. A Elmer Guillén por su ayuda solidaria.

A mi hija Irina, por su comprensión, apoyo y amor.

## INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	5
2.1. Clasificación y Botánica del género <i>Musa</i> .	5
2.1.1. Clasificación	5
2.1.2. Botánica.	6
2.2. Descripción del fenómeno de embriogénesis somática.	7
2.3. Factores que afectan la embriogénesis somática	10
2.3.1. Genotipo	10
2.3.1. Explante	10
2.3.3. Composición del medio de cultivo	10
2.4. Importancia y usos de la embriogénesis somática en la multiplicación de plantas y transformación genética.	11
2.5. Embriogénesis somática en las Musáceas.	13
3. MATERIALES Y METODOS	15
3.1. Cultivares.	15
3.2. Desinfección y siembra del explante.	15
3.3. Iniciación de callos y cultivos embriogénicos	17
3.3.1. Ensayo 1: Dosis de 2,4-D y sacarosa.	17
3.3.2. Ensayo 2: Dosis de prolina y zeatina.	18
3.3.3. Ensayo 3: Tipos de envase y su influencia en el desarrollo de los cultivos.	19
3.3.4. Diseño experimental y análisis de los resultados.	20
3.4. Estudio de las suspensiones celulares.	20
3.4.1. Establecimiento y mantenimiento.	20
3.4.2. Estudio del crecimiento de las suspensiones.	21
3.4.3. Germinación de embriones somáticos.	22
3.5. Método de Inmersión Temporal.	23
3.5.1. Mantenimiento.	23
3.5.2. Germinación de los embriones somáticos.	24

3.6. Regeneración de plantas.	25
3.7. Estudios histológicos	25
4. RESULTADOS y DISCUSION	26
4.1. Iniciación de callos y cultivos embriogénicos.	26
4.1.1. Ensayo de Dosis de sacarosa y 2,4-D.	26
4.1.1.1. Respuesta de los explantes Cv. Gran Enano.	26
4.1.1.2. Efecto de la sacarosa.	30
4.1.1.3. Efecto del 2,4-D	31
4.1.1.4. Resultados con otros cultivares.	32
4.1.2. Ensayo 2. Dosis de prolina y zeatina. Cv. Gran Enano.	33
4.1.2.1. Respuesta de los explantes a la zeatina y prolina.	33
4.1.2.2. Efecto de la zeatina en la formación de callos.	34
4.1.2.3. Efecto de la prolina .	35
4.1.2.4. Ensayo 2. Cultivar Gros Michel.	36
4.1.3. Ensayo de tipos de envase.	38
4.1.4. Respuesta de las manitos de flores de acuerdo a su posición	39
4.2. Suspensiones Celulares.	41
4.2.1. Tipos de células y contenido citoplasmático.	41
4.2.2. Respuesta a los medios de cultivo.	42
4.2.2.1. Cultivar Dominico.	42
4.2.2.2. Cultivar Gros Michel.	42
4.2.2.3. Cultivar Gran Enano.	43
4.2.3. Suspensiones celulares finas.	36
4.2.4. Medición del volumen celular.	47
4.2.5. Diferenciación de embriones somáticos en medio Ma-3 líquido y semi-sólido.	49
4.2.6. Germinación de embriones somáticos	54
4.2.6.1. Germinación en medio sólido.	54
4.2.6.2. Germinación en medio líquido.	56
4.3. Método de Inmersión Temporal.	57
4.3.1. Cultivar Dominico.	57
4.3.1.1. Etapa de multiplicación.	57
4.3.1.2. Etapa de Germinación.	57
4.3.2. Cultivar Gros Michel.	59
4.3.2.1. Etapa de multiplicación.	59
3.2.2. Etapa de Germinación.	60
4.3.3. Desarrollo de las plantas.	63

4.4. Estudios Histológicos.	65
4.4.1. Caracterización de las manitos de flores masculinas.	65
4.4.2. Desarrollo de los callos y cultivos embrionarios.	67
5. CONCLUSIONES	73
6. RECOMENDACIONES	75
7. LITERATURA CITADA	76
8. ANEXOS	81



BIEBERACH FORERO, C.Y. 1995. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* sp. Tesis Mag. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 86 p.

PALABRAS CLAVES: embriogénesis somática, *Musa* sp., suspensiones celulares, inmersión temporal, "Dominico", "EMBRAPA 403", "Gran Enano", "Gros Michel", Inflorescencias masculinas.

## RESUMEN

Se estudió la embriogénesis somática en cuatro cultivares de *Musa* sp., utilizando como explante las inflorescencias masculinas próximas al meristemo floral.

La investigación se dividió en cuatro partes: inducción de cultivos embriogénicos, establecimiento de suspensiones celulares, multiplicación y germinación de embriones somáticos con el método de inmersión temporal y estudio histológico del desarrollo de callos y cultivos embriogénicos.

Para inducir la formación de cultivos embriogénicos se probó la influencia de la sacarosa (30, 60 y 120 g/l) y el 2,4-D (1, 2 y 4 mg/l). La inducción de callos friables y cultivos embriogénicos de Gran Enano se logró con 30 g/l sacarosa y 4 mg/l de 2,4-D. El Cv. Gros Michel formó cultivos embriogénicos en medio con 30 g sacarosa + 2 mg de 2,4-D y 30 g sacarosa + 1 mg 2,4-D. Se consiguió la formación de cultivos embriogénicos de EMBRAPA 403 en medio con 30 g sacarosa y 4 mg de 2,4-D; también, el Cv. Dominico produjo cultivos embriogénicos en el tratamiento 30 g de sacarosa + 1 mg 2,4-D y 60 g de sacarosa + 2 mg 2,4-D.

En otro ensayo se probó la influencia de zeatina (0,2 y 1,0 mg/l) y prolina (690 mg/l) en la formación de callos y cultivos embriogénicos de los Cvs. Gran Enano y Gros Michel. Hubo formación de callos friables en medio con zeatina (0,2 y 1 mg) sin prolina; y de cultivos embriogénicos de Gran Enano con prolina

690 sin zeatina. Se formaron callos friables y cultivos embrilogénicos de Gros Michel con 0,2 mg de zeatina sin prolina. La respuesta embrilogénica en todos los ensayos estuvo concentrada en las manitos de flores del rango 8 a 13.

Se establecieron suspensiones celulares de Dominico, Gran Enano y Gros Michel. El crecimiento de las suspensiones se determinó por el método de compactación del volumen celular (PCV). Las suspensiones adquirieron capacidad embrilogénica después de 21-30 días de iniciadas; sin embargo, la formación de embriones somáticos maduros se observó después de 4 meses de cultivo en suspensiones de Gran Enano y después de seis meses en las de Dominico.

El plaqueo de las suspensiones entre 3 a 6 meses resultó en la diferenciación de embriones somáticos, tanto en medio líquido agitado como en medio semi-sólido. La cantidad promedio de embriones somáticos diferenciados a partir de 1 ml de suspensión celular fue de 439 en medio líquido y 197 en medio semi-sólido.

La germinación de los embriones somáticos del cultivar Dominico ocurrió en medio semi-sólido y líquido, pero en bajos porcentajes.

El método de inmersión temporal permitió multiplicar la cantidad de embriones somáticos en 78 y 486 veces, para los cultivares Dominico y Gros Michel, respectivamente.

Se logró la regeneración de plantas del Cv. Dominico a partir de suspensiones celulares y con el método de inmersión temporal. También con el método de inmersión temporal se obtuvieron plantas del Cv. Gros Michel.

El estudio histológico de las inflorescencias masculinas mostró la formación de centros meristemáticos cerca de los elementos vasculares, diferenciados durante el cultivo *in vitro*, de los cuales se originan las células embrilogénicas. Además, la acumulación y utilización de reservas en el citoplasma precede a la formación de los cultivos embrilogénicos.

BIEBERACH FORERO, C.Y. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Musa* sp. cultivars. Master of Science Thesis. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 86 p.

Key words: Somatic embryogenesis, *Musa* sp., cell suspension, temporary immersion, "Dominico", "EMBRAPA 403", "Grande Naine", "Gros Michel", male flowers.

## SUMMARY

Somatic embryogenesis of four *Musa* sp. cultivars was studied using male flowers next to the floral meristem as explant.

The investigation was divided into four steps: embryogenic culture induction, cell suspension establishment, multiplication and germination of somatic embryos with the temporary immersion system, and histological study of the development of calli and embryogenic cultures.

In order to induce embryogenic culture, sucrose influence was tested at 30, 60, 120 g/l and 2,4-D at 1,2,4 mg/l. Friable calli and embryogenic culture induction of Grande Naine were attained with 30 g/l sucrose and 4mg/l 2,4-D. Cv. Gros Michel formed embryogenic cultures in medium with 30 g/l sucrose + 1 or 2 mg/l of 2,4-D. EMBRAPA 403 embryogenic culture formation was obtained in culture medium with 30 g/l sucrose and 4 mg/l 2,4-D. Cv. Dominico also produced embryogenic cultures in a treatment with 30 g/l sucrose + 1 mg/l 2,4-D and 60 g/l sucrose + 2 mg/l 2,4-D.

Another experiment consisted in testing zeatin influence (0.2 and 1 mg/l) and proline (690 mg/l) in callus and embryogenic culture formation of Cvs. Grande Naine and Gros Michel. Friable calli formation occurred by means of zeatin (0,2 and 1 mg) without proline; and Grande Naine embryogenic cultures with 690 proline without zeatin. Friable calli and Gros Michel embryogenic cultures formed with 0,2 mg of zeatin without proline. Embryogenic responses in all experiments was concentrated in the floral clusters between range 8 to 13.

Cell suspensions of Dominico, Grande Naine and Gros Michel were established. Suspension growth was determined by the packed cell volume method (PCV). The suspensions acquired embryogenetic capacity 21 to 30 days after initiation. However, somatic embryo formation was observed after four months of culture in suspensions of Grande Naine and after six months in those of Dominico.

The plating of suspensions after three to six months culturing resulted in somatic embryo differentiation in both media, liquid agitated and semi-solid. Average quantity of differentiated somatic embryos from one ml of cell suspension was 439 in liquid medium and 197 in semi-solid medium.

Somatic embryos germination of the Cv. Dominico was achieved in medium semi-solid y liquid, but in low percentages.

The temporary immersion method allowed to increase somatic embryos quantity in 78 and 486 instances for Cvs. Dominico and Gros Michel, respectively.

Plant regeneration of Cv. Dominico was achieved with both, cell suspensions and the temporary immersion methods. Cv. Gros Michel plants were also obtained with the temporary immersion method.

The histological study of male flowers showed meristematic nodules forming near the vascular elements. Embriogenic cells are differentiated from these meristematic nodules after 3 months of culture. Moreover, it has been possible to illustrate the accumulation and utilization of reserves in the cytoplasm during embryogenic culture formation.

**BIEBERACH FORERO, C.Y. 1995. Embryogenèse somatique et régénération de plantes chez les cultivars de *Musa sp.* Thèse de 'Master of Science'. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 86 p.**

**MOTS CLES:** Embryogenèse somatique, *Musa sp.*, Suspensions cellulaires, Immersion temporaire, 'Grande Naine', 'EMBRAPA 403', 'Gros Michel', 'Plantain type French', Inflorescence masculine.

## **RÉSUMÉ**

**On a étudié l'embryogenèse somatique à partir d'inflorescences mâles proche du méristème floral de quatre cultivars de *Musa sp.***

**Les recherches ont été divisées en quatre parties: l'induction de la culture embryogène, l'établissement des suspensions cellulaires, la multiplication et la germination des embrions somatiques dans le système d'immersion temporaire et l'étude histologique du développement des cals et des cultures embryogènes.**

**Pour induire la formation des cultures embryogènes, différentes doses de saccharose (30, 60 et 120 g/l) et de 2,4-D (1, 2 et 4 mg/l) ont été testées. L'induction de cals friables et des cultures embryogènes a pu être obtenu pour le cultivar 'Grande Naine' en utilisant 30 g/l de saccharose et 4 mg/l de 2,4-D. Le cultivar 'Gros Michel' a permis la formation de cultures embryogènes lors de l'utilisation de milieux contenant 30 g/l de saccharose avec 1 ou 2 mg/l de 2,4-D. On a pu obtenir la formation de cultures embryogènes de EMBRAPA 403 sur le milieu contenant 30g/l de saccharose et 4 mg/l de 2,4-D. Le cultivar 'Plantain type French' a permis l'obtention de cultures embryogènes au cours des traitements comprenant 30g/l de saccharose + 1mg/l de 2,4-D et 60 g/l de saccharose + 2mg/l de 2,4-D.**

**Dans un autre essai, on a voulu tester l'influence de la zéatine (0,2 et 1mg/l) et de la proline (690mg/l) sur la formation des cultures embryogènes à partir des cultivars 'Gros Michel' et 'Grande Naine'. Dans le cas de 'Grande Naine', on a pu observer la formation de cals friables sur les milieux avec zéatine (0.2 et 1mg/). La présence de proline (690mg/l) sans zéatine a permis la formation de cultures embryogènes. Pour ce qui est du cultivar 'Gros Michel', la formation de cals friables comme de cultures embryogènes a pu être obtenue avec 2mg/l de zéatine sans proline. Dans tous les essais les réactions embryogènes ont été obtenues sur les fleurs des rangs 8 à 13.**

**On a pu établir des suspensions cellulaires à partir des cultivars 'Gros Michel', 'Grande Naine' et 'Plantain type French'. La croissance des suspensions a été mesurée par la méthode du "Pack Cell Volume" (PCV). Les suspensions acquièrent**

**une capacité embryogène 21-30 jours après leur initiation. Cependant, la formation d'embryons somatiques différenciés a pu être observée après 4 mois de culture dans le cas des suspensions de 'Grande Naine' et après 6 mois dans le cas de 'Plantain type French'.**

**L'étalement des suspensions entre 3 et 6 semaines de cultures a permis la différenciation d'embryons somatiques, aussi bien en milieu liquide agité que sur milieu solide. La quantité moyenne d'embryons somatiques différenciés à partir d'1ml de suspension cellulaire est de 439 embryons en milieu liquide et 197 en milieu solide.**

**La germination des embryons somatiques du cultivar 'Plantain type French' a pu être obtenue aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide, mais dans des pourcentages plus faibles.**

**La méthode d'immersion temporaire permet de multiplier le nombre d'embryons somatiques par 78 et 486 pour respectivement 'Plantain type French' et 'Gros Michel'.**

**La régénération de plantes a pu être obtenue tant à partir des suspensions cellulaires que du système d'immersion temporaire, ceci pour les cultivars 'Gros Michel' et 'Plantain type French'.**

**L'étude histologique des inflorescences mâles permet d'observer la formation de centres méristématiques près des vaisseaux vasculaires durant la culture in vitro. Les cellules embryogènes se forment à partir de ces éléments méristématiques. On a aussi pu illustrer l'utilisation des réserves du cytoplasme durant la phase précédant la formation de la culture embryogène.**

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Respuesta de los explantes a los tratamientos con 2,4-D y sacarosa. Cv. Gran Enano.	28
Cuadro 2. Porcentaje de manitos que formaron Callos Friables y Cultivos Embriogénicos en los tratamientos con sacarosa y 2,4-D. Cv. Gran Enano.	29
Cuadro 3. Efecto de la sacarosa en la formación de Callos Friables y Cultivos Embriogénicos. Cv. Gran Enano.	30
Cuadro 4. Efecto del 2,4-D en la formación de Callos Friables y Cultivos Embriogénicos. Cv. Gran Enano.	31
Cuadro 5. Porcentaje de manitos que formaron Callos Friables y Cultivos Embriogénicos en los cultivares EMBRAPA 403, Dominico y Gros Michel	32
Cuadro 6. Porcentaje de manitos que formaron Callos Friables y Cultivos Embriogénicos en los tratamientos con prolina y zeatina. Cv. Gran Enano	34
Cuadro 7. Efecto de la zeatina en la formación de CF y CE. Cv. Gran Enano	34
Cuadro 8. Efecto de la prolina en la formación de CF y CE. Cv. Gran Enano	35
Cuadro 9. Porcentajes de manitos que formaron Callos Friables y Cultivos Embriogénicos en los tratamientos con prolina y zeatina. Cv. Gros Michel.	36
Cuadro 10. Efecto de la zeatina en la formación de CF y CE. Cv. Gros Michel	37
Cuadro 11. Efecto de la prolina en la formación de CF y CE. Cv. Gros Michel	37

Cuadro 12. Características de las suspensiones del cultivar Gran Enano, cultivadas en cuatro medios diferentes.	44
Cuadro 13. Peso promedio (mg) de los embriones somáticos.	51
Cuadro 14. Número de embriones somáticos formados a partir de 1 ml de suspensión celular en medio Ma-3 semi-sólido y líquido	53
Cuadro 15. Porcentaje de germinación de embriones somáticos en medio semi-sólido.	55
Cuadro 16. Germinación de embriones somáticos Cv. Dominico en medio líquido.	56
Cuadro 17. Porcentaje de germinación de embriones somáticos Cv. Dominico en el sistema de inmersión temporal.	58
Cuadro 18. Porcentaje de germinación de embriones somáticos Cv. Gros Michel en el sistema de inmersión temporal.	60



Cuadro 12. Características de las suspensiones del cultivar Gran Enano, cultivadas en cuatro medios diferentes.	44
Cuadro 13. Peso promedio (mg) de los embriones somáticos.	51
Cuadro 14. Número de embriones somáticos formados a partir de 1 ml de suspensión celular en medio Ma-3 semi-sólido y líquido	53
Cuadro 15. Porcentaje de germinación de embriones somáticos en medio semi-sólido.	55
Cuadro 16. Germinación de embriones somáticos Cv. Dominico en medio líquido.	56
Cuadro 17. Porcentaje de germinación de embriones somáticos Cv. Dominico en el sistema de inmersión temporal.	58
Cuadro 18. Porcentaje de germinación de embriones somáticos Cv. Gros Michel en el sistema de inmersión temporal.	60

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inflorescencia masculina de las Musáceas	16
Figura 2. Esquema de trabajo con las suspensiones celulares	22
Figura 3. Esquema de cultivo y obtención de plantas con el método de inmersión temporal.	24
Figura 4. Callos friables y cultivos embriogénicos	27
Figura 5. Respuesta de las manitos de flores de acuerdo a su posición	40
Figura 6. Etapas en el desarrollo de una suspensión embriogénica	45
Figura 7. Aumento del volumen celular en suspensiones del Cv. Dominico	48
Figura 8. Aumento del volumen celular en suspensiones del Cv. Gran Enano	49
Figura 9. Diferenciación de embriones somáticos a partir de 1 ml de suspensión celular Cv. Dominico.	52
Figura 10. Aumento del peso de los cultivos en el sistema de inmersión temporal Cv. Dominico	58
Figura 11. Aumento del peso de los cultivos en el sistema de inmersión temporal Cv. Gros Michel	59
Figura 12. Contenido citoplasmático en células en suspensión y en el sistema de inmersión temporal	62
Figura 13. Desarrollo de los cultivos con el método de inmersión temporal	64
Figura 14. Cortes histológicos en manitos de flores	66
Figura 15. Cortes histológicos en manitos del Cultivar Gran Enano	68
Figura 16. Embriones somáticos diferenciados en callos friables embriogénicos de Gran Enano	70
Figura 17. Cortes histológicos de cultivos de seis meses. Cv. Gran Enano	72

## **INDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo 1. Medios de Cultivo</b>	<b>81</b>
<b>Anexo 2. Esquema del sistema de inmersión temporal</b>	<b>84</b>
<b>Anexo 3. Preparación de cortes histológicos</b>	<b>85</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Acido abscísico
AIA	Acido 3 - indolacético
ANA	Acido naftalenoacético
BA	6 - Bencil amino purina
CE	Cultivo embriogénico
CF	Callo friable
2,4-D	Acido 2,4- diclorofenoxiacético
2 ip	6 - (dimetilamino) purina (2 - isopentenil adenina)
Pi	Picloram (Acido 4- amino - 3,5,6- triclorofenoxiacético)

## 1. INTRODUCCION

El banano y el plátano son importantes fuentes alimenticias en las regiones productoras de América Tropical, a la vez que tienen un gran valor económico, por la generación de divisas en los países exportadores.

En todos los países productores, el banano y el plátano juegan un papel importante en la complementación de la dieta alimentaria de las poblaciones de bajos ingresos (Alves, 1990). La producción de bananos para 1992 en América Latina fue de 20,966,000 toneladas métricas y la de plátanos, de 6,432,000 toneladas métricas (FAO, 1993). Cerca del 50% de la producción de bananos se consume dentro de los países productores y el resto se exporta; en el caso del plátano, casi la totalidad de la producción de la región es usada como alimento básico (Bureau et al., 1992). El plátano se produce como un cultivo de subsistencia, asociado a cultivos de café o cacao (Augura, 1989), mientras que la producción de bananos para la exportación es muy tecnificada.

El género *Musa* es originario del Sureste Asiático, en donde se encuentra su mayor diversidad genética. El cultivo de éstas plantas es afectado por diversos factores bióticos, los cuales en algunas épocas han hecho casi desaparecer algunos cultivares en diversos lugares. Tal es el caso de la enfermedad conocida como marchitez por *Fusarium*, causada por el hongo *Fusarium oxysporium f. sp. cubense*, la cual originó pérdidas cuantiosas, cuando la raza 1 de éste patógeno atacó la variedad Gros Michel.

Esta fue reemplazada por variedades del subgrupo Cavendish, que actualmente están siendo atacadas por la raza 4 del mismo patógeno, en Taiwan, Sudafrica y Australia (Rowe y Rosales, 1989).

También la Sigatoka negra, cuyo agente causal es *Mycosphaerella fijiensis*, en su forma sexual y *Paracercospora fijiensis*, en su forma asexual, ocasiona grandes pérdidas en la producción y también la reducción del área de cultivo de bananos y plátanos. Por ejemplo, en Panamá en 1985, el 22% de la superficie cultivada de plátano fue abandonada por causa de esta enfermedad, así mismo

la producción nacional disminuyó en un 47 % y la exportación fue suspendida totalmente (Acosta de Guerra et al., 1987).

La resistencia genética presente en los cultivares diploides es la forma más recomendable para el control de éstas enfermedades (Rowe y Rosales, 1989).

Mediante el uso de plantas resistentes, las exigencias de aplicación de plaguicidas disminuirían considerablemente, contribuyendo a reducir los costos de producción y a preservar el medio ambiente.

Hasta el momento, los avances en el mejoramiento genético de las Musáceas han sido posibles mediante la utilización de las técnicas de mejoramiento convencional.

La estrategia utilizada comprendió el desarrollo de diploides resistentes (*Musa AA*), en los cuales a la vez se mejoraron las características agronómicas, tales como el tamaño de racimo y frutos, y que sirvieron de base para la creación de diploides con combinaciones de excelencia agronómica y resistencia a la Sigatoka negra, el nemátodo barrenador y la raza 4 de *Fusarium* (Rowe, 1987). Los diploides mejorados fueron utilizados en cruzamientos con cultivares triploides, con fertilidad femenina, para desarrollar tetraploides con buenas características. Todo este trabajo sentó las bases para el desarrollo de los triploides, mediante cruzamientos entre  $2n \times 4n$ . Una metodología similar se está aplicando al mejoramiento de los plátanos en la FHIA, en Honduras (Rowe, 1987).

Otra vía para el mejoramiento genético ha sido el cultivo de tejidos, explotando la variación somaclonal surgida durante el cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos (Hwang, 1988).

El mejoramiento genético por métodos convencionales, enfrenta algunas dificultades debido a la baja fertilidad femenina y la baja germinación de la semilla, lo cual hace necesario la polinización de gran número de racimos para obtener una buena cantidad de semillas. Estas dificultades pueden superarse desarrollando alternativas de mejoramiento por medio de la biotecnología. La embriogénesis somática y el cultivo de protoplastos permitirían incrementar la

variabilidad genética existente; sin embargo, éstas técnicas apenas están en proceso de desarrollo para el género *Musa*.

Los embriones somáticos son materiales excelentes para la introducción de genes, por medio de la ingeniería genética, así como para la inducción de mutaciones; además, se conceptúan como un material muy apropiado para estudios de selección *in vitro*, usando toxinas de hongos.

El mejoramiento genético de *Musa* ha requerido de alrededor de 60 años de investigación para conseguir importantes resultados. Si bien, el cultivo de tejidos podría aportar una vía más corta, es necesario desarrollar, de forma prioritaria (INIBAP, 1993), las siguientes tecnologías:

- sistemas eficientes de propagación de plantas en forma masiva, incluyendo la producción a escala y la automatización,
- técnicas de embriogénesis somática y cultivo de células para la selección y regeneración de plantas transformadas,
- técnicas de fusión de protoplastos para obtener híbridos somáticos,
- un sistema eficiente de transformación de plantas, por medio de la ingeniería genética.
- mapas de ligamiento genético de *Musa*.

La integración de estas técnicas a los programas de mejoramiento genético, ayudaría a superar las barreras existentes para la completa utilización del acervo genético del género *Musa*.

La presente investigación tuvo como objetivo inducir el desarrollo de embriones somáticos en algunos cultivares del género *Musa*, utilizando flores masculinas como explante primario, como parte esencial de un sistema de regeneración de plantas útil para la transformación genética, el mejoramiento genético de bananos y plátanos, y la propagación masiva de clones mejorados.

Los objetivos específicos fueron:

- Obtener cultivos embriogénicos a partir de flores masculinas de algunos cultivares del género *Musa*, pertenecientes a los grupos AAA, AAB y AAAB.
- Establecer y estudiar las suspensiones celulares derivadas de cultivos embriogénicos.
- Estudiar el crecimiento de cultivos embriogénicos y embriones somáticos bajo el método de Inmersión temporal.
- Obtener embriones somáticos maduros y lograr la regeneración de plantas completas.



## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Clasificación y Botánica del género *Musa*.

#### 2.1.1. Clasificación.

La familia *Musaceae* pertenece al orden *Scitamineae*, el cual comprende dos géneros: *Ensete* y *Musa*. El género *Musa* está dividido en cinco secciones, de las cuales la más grande es la sección *Eumusa* ( $n=11$ ), que comprende la mayoría de los bananos y plátanos comestibles ( $2n = 22, 33, 44$ ) (Stover y Simmonds, 1987).

El género *Musa* contiene entre 30 y 40 especies diploides, de las cuales solo unas pocas son importantes, tales como *Musa acuminata* y *M. balbisiana*, ambos con número cromosómico  $2n = 22$  y cuyos genomas se representan como A y B, respectivamente (Simmonds, 1987). El mismo autor señala que un paso importante en la evolución de los bananos comestibles fue el desarrollo de la partenocarpia y la esterilidad de las semillas, bajo la selección realizada por los humanos, originando los cultivares diploides comestibles de *M. acuminata* (AA). A partir de los cultivares AA, por restitución cromosómica en la meiosis surgieron los triploides AAA. Otro paso importante fue el cruzamiento entre los cultivares AA, y posiblemente AAA, con el silvestre *M. balbisiana* (BB), del cual surgieron los híbridos AB, AAB, ABB, AAAB, AABB. De éstos, los grupos AAB y ABB son los de mayor importancia económica.

Los bananos y plátanos cultivados pertenecen a tres grupos:

- a. Los bananos del grupo AAA: comprende las variedades que se cultivan para exportación de sus frutos, como el "Gros Michel" y "Cavendish" y otros como el Higo Rosa.
- b. Los cultivares del grupo AAB: se compone de varios subgrupos, uno de los principales es el llamado grupo de los "Plantains", cuyos frutos se consumen cocidos. Se distinguen dos tipos principales: el french y el cuerno. También

este grupo contiene al subgrupo Silk (Figue Pomme), que se caracteriza por el sabor agridulce de los frutos, al cual pertenece el cultivar Manzano y, el subgrupo Pomé, al que pertenece el cultivar "Prata".

- c. Los plátanos de cocción del grupo ABB: los principales cultivares pertenecen al subgrupo Bluggoe.

El genoma de *balbisiana* es importante en algunas características relacionadas con la tolerancia a zonas más secas, lo cual permitió la extensión del área geográfica cubierta por el género *Musa* a través de los grupos híbridos, la rusticidad, resistencia a enfermedades, el contenido de almidón y la acidez (Simmonds, 1987).

Varias subespecies de *M. acuminata* poseen genes de resistencia a la Sigatoka negra, a la marchitez por *Fusarium*, a *Pseudomonas solanacearum* y al nemátodo barrenador *Radopholus similis* (Stover y Buddenhagen, 1986).

### 2.1.2. Botánica.

En general, las Musáceas se distinguen por su falso tallo, formado por hojas enrolladas fuertemente unidas, y el verdadero tallo o cormo situado a ras del suelo, durante el crecimiento vegetativo.

El meristemo apical se encuentra situado en el centro del cormo. Alrededor de éste se encuentran yemas dispuestas helicoidalmente. Las hojas más jóvenes se desarrollan internamente.

Después de haber emitido aproximadamente la mitad del número de hojas funcionales, el meristemo apical se diferencia en meristemo floral, y se inicia el crecimiento del verdadero tallo. La zona meristemática adquiere una forma cónica. Antes de la emergencia de la inflorescencia la planta emite todas las hojas funcionales (Champion, 1978).

La flor de las Musáceas es una inflorescencia compuesta, subterminal, subtendida por grandes brácteas, que son los escapos de la inflorescencia.

La inflorescencia está compuesta por flores dispuestas en dos hileras imbricadas y oprimidas entre la bráctea que la recubre y la yema subyacente. Los grupos de flores se denominan "manos", y las flores, "dedos". Cada mano puede tener de 4 a 8 flores por hilera, colocadas en posición alterna las de una fila con la siguiente (León, 1987).

La inflorescencia comprende varias manos de flores femeninas que, en condiciones óptimas, puede llegar a trece o catorce (Champion, 1978). Después de que el meristemo ha producido flores femeninas se opera un cambio y aparecen grupos de flores masculinas. Las flores femeninas o pistiladas tienen el carpelo bien desarrollado y estambres reducidos de anteras no funcionales; las flores masculinas o estaminadas tienen ovario reducido y 6 estambres, a veces 5 estambres y un estaminodio (León, 1987).

La planta continúa formando flores masculinas casi hasta el final de su vida. Las flores femeninas carecen de capa de abscisión mientras que las masculinas sí la poseen. Las brácteas junto con las flores están sostenidas por una excrecencia del eje floral, llamada "cojín" o "almohadilla". Las piezas florales se desecan pronto y caen; las brácteas se levantan cada día y se descubre una mano de flores masculinas. En las variedades gigantes, las brácteas caen pocas horas después de descubrirse las flores, en cambio en las enanas persisten largo tiempo (Champion, 1978).

El desarrollo del ovario en los triploides comerciales se presenta sin la intervención del polen, el cual no existe en estos cultivares.

## **2.2. Descripción del fenómeno de embriogénesis somática.**

La embriogénesis somática es un fenómeno biológico basado en la totipotencialidad de las células vegetales, descrita por Haberlandt en 1902.

Esta teoría explica la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de cualquier célula de una planta, debido a que cada célula contiene la información genética necesaria para producir un organismo completo.

La embriogénesis somática es el proceso por el cual las células somáticas se desarrollan en plantas diferenciadas a través de estados embriogénicos característicos sin la fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986).

Haccius (1978), describió un embrión vegetal (cigótico o no cigótico), como un nuevo individuo que surge de una célula individual y que no tiene conexiones vasculares con el tejido materno.

El origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos es un punto controversial. Al respecto Williams y Maheswaran (1986) señalan cuatro posibles vías de desarrollo:

- origen unicelular a partir de células individuales de epidermis madura,
- origen multicelular de más de una capa de células meristemáticas (poliembrionía por división),
- origen multicelular a partir de una capa de células de epidermis inmadura; estas tres formas son posibles cuando existen células pre-embriogénicas determinadas en el explante.
- La cuarta vía requiere la inducción del estado embriogénico, la formación de un callo y la redeterminación de las células de éste.

Según Parrot (1993), la inducción de la embriogénesis somática envuelve la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica. El origen uni o multicelular de los embriones somáticos, según Maheswaran y Williams (1985), constituyen expresiones variadas del mismo fenómeno, y depende del grado de sincronización del estado interno pre-embriogénico determinado y de la habilidad de las células para interactuar como grupo o como células individuales. También concluyen que el origen multicelular produce aparentemente embriones fusionados al tejido materno en un área grande, mientras que en el origen unicelular los embriones están unidos por un suspensor.

Contrariamente a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo juego de genes, sino que poseen la misma combinación genética que la planta de la cual se originan.

Los embriones somáticos son estructuras bipolares, que poseen un eje apical- radical, aisladas por un tejido epidérmico, y que no poseen conexión vascular con el tejido materno (Litz y Jarret, 1991)

La embriogénesis somática puede ocurrir mediante la formación de un callo embriogénico, previa desdiferenciación de las células del explante (embriogénesis indirecta), o directamente de las células del explante desdiferenciadas y vueltas a diferenciar con un programa embriogénico (embriogénesis directa).

La embriogénesis cigótica y somática guardan alguna similitud en cuanto a los eventos fisiológicos, bioquímicos y anatómicos que presentan; sin embargo, existen diferencias en el contenido de sustancias de reservas y en el estado de desarrollo en que éstas se acumulan. Así, Feirer *et al.* (1989) encontraron que el contenido de triglicéridos en embriones cigóticos de *Picea abies L.* fue mayor que en los embriones somáticos. Crouch (1982) encontró la misma proteína de reserva en embriones cigóticos y somáticos de *Brassica napus L.*, aún cuando el nivel y el tiempo de acumulación difieren. Sannasgala (1989), observó similitudes (en la estructura anatómica) y diferencias ( en los estados de desarrollo) entre los embriones cigóticos y somáticos de *Musa*.

El fenómeno de embriogénesis somática ha sido ampliamente estudiado en la zanahoria, desde que Steward y Reinert, en 1958, obtuvieron embriones somáticos en cultivos de suspensiones de células del floema.

La embriogénesis somática tiene varias etapas: la inducción del estado embriogénico, la diferenciación en embrión, la maduración, germinación y la regeneración de plantas (Parrot, 1993).

## **2.3. Factores que afectan la embriogénesis somática.**

### **2.3.1. Genotipo:**

Diferentes genotipos varían en su habilidad de realizar la embriogénesis somática; tales diferencias en la capacidad embriogénica probablemente reflejan diferencias en la habilidad de activar las rutas embriogénicas (Parrot, 1993).

### **2.3.2. Explante:**

La eficiencia del proceso de embriogénesis somática depende del tipo de tejido usado como explante. Por ejemplo: células del mesófilo y protoplastos de alfalfa pueden ser inducidos a formar embriones somáticos sin pasar por la fase de formación de callos; los tejidos de hojas de cereales no responden de la misma forma, en este caso los mejores explantes son los embriones cigóticos inmaduros o las inflorescencias inmaduras, los cuales forman un callo embriogénico (Lindsey y Topping, 1993). En Musáceas se ha usado como explantes los embriones cigóticos inmaduros, tejido de cormo, hojas basales, yemas axilares. Según Parrot (1993) en aquellos cultivos en los cuales la fase de callo precede a la formación del embrión somático cualquier tejido puede servir como explante.

### **2.3.3. Composición del medio de cultivo:**

La inducción del estado embriogénico usualmente requiere de una auxina en el medio de cultivo. El tipo de auxina requerida y su concentración puede variar entre especies, aún dentro del mismo género. En Musáceas se ha utilizado el 2,4-D, dicamba, 2,4,5-T, picloram, AIA, ANA, o la combinación de ellas en un mismo medio (Cronauer y Krikorian, 1988; Novak *et al.*, 1989; Escalant y Teisson, 1989; Marroquín *et al.*, 1993; Escalant *et al.*, 1994a, 1994b).

El papel de las auxinas en la inducción de la embriogénesis somática está relacionado con la metilación del ADN, lo cual resulta en la disminución o cese de la expresión del programa genético de la célula. También, las auxinas pueden aislar células o grupos de células, por daño de los plasmodesmos, por un aumento de la friabilidad de los tejidos o por necrosis de los tejidos. Seguidamente el transporte polar de auxinas impone la polaridad del embrión somático (Parrot, 1993).

Las auxinas son importantes para la inducción del estado embriogénico, pero en las etapas siguientes la presencia de auxinas puede inhibir el desarrollo y la maduración de los embriones somáticos, puesto que esta última ocurre en ausencia de reguladores del crecimiento. Para la germinación de los embriones de *Musa* sp. se requieren bajas concentraciones de auxinas, como AIA (Marroquín, 1991) o ANA (Escalant y Teisson, 1989).

En algunas especies se ha encontrado influencia de la concentración de iones  $\text{NH}_4^+$  (Chée et al., 1992), y de la concentración de sacarosa (May y Trigiano, 1991) sobre la formación de callo embriogénico y de embriones somáticos. La interacción de bajos niveles de auxinas (1mg/l o menos) y dosis altas de sacarosa (6 - 12 %) mejora la formación de embriones somáticos en algunas especies (Finner, 1987). También, la adición de prolina al medio de cultivo favorece la formación de embriones somáticos (Armstrong y Green, 1985).

#### **2.4. Importancia y usos de la embriogénesis somática en la multiplicación de plantas y transformación genética.**

Desde el punto de vista de la propagación de plantas, se considera la embriogénesis somática como un método eficiente; entendiendo la eficiencia como el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo (Villalobos y Thorpe 1991). Esto es válido si se consideran plantas modelos, o aquellas especies en las cuales el proceso embriogénico y los factores que lo afectan

son controlados.

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

Utilizando el método de suspensiones celulares es posible obtener a partir de cada célula en suspensión un embrión somático y una planta, lo cual produciría un gran número de plantas por suspensión (Villalobos y Thorpe 1991). El cultivo de suspensiones embriogénicas es el primer paso en el desarrollo de la propagación a gran escala usando bioreactores y en la tecnología de semillas artificiales de bananos y plátanos (Novak et al., 1989).

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. Otra ventaja es que la embriogénesis somática es menos susceptible de variación somacional, presumiblemente debido a que ésta ocasionaría el colapso de la ontogenia normal de los embriones somáticos (Parrot, 1993). Esto es particularmente ventajoso durante la transformación genética, donde solo se desea cambiar una característica.

En el mejoramiento genético convencional los genes son transferidos entre individuos sexualmente compatibles y fértiles. Los más importantes cultivares de las Musáceas son triploides, que carecen de la condición de fertilidad, lo que dificulta el uso del método tradicional de mejoramiento genético a través de cruzamientos, posible en los diploides.

Un sistema de regeneración masiva de plantas por embriogénesis somática ofrecería 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.



## 2.5. Embriogénesis somática en las Musáceas.

Varios investigadores han logrado obtener embriones somáticos de Musáceas, utilizando diferentes explantes, medios de cultivos y esquemas de regeneración. El primer informe de embriogénesis somática en Musáceas corresponde a Cronauer y Krikorian (1983), quienes lograron embriones a partir de suspensiones celulares derivadas de ápices cultivados *in vitro* de los triploides Saba y Pellpita (*Musa* ABB). Los mismos autores, en 1988, obtuvieron embriones somáticos de *Musa ornata* Roxb., cultivando embriones cigóticos inmaduros de este diploide ornamental.

Escalant y Telsson (1988, 1989), cultivaron embriones cigóticos inmaduros de un híbrido entre *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, en medio semi-sólido, logrando la formación de embriones somáticos.

En 1988 y 1989 Novak et al., obtuvieron embriones somáticos, cultivando suspensiones celulares iniciadas a partir de callos embriogénicos del diploide Bocadillo (*Musa* AA), el híbrido SH 3362 (*Musa* AA), Gran Enano (*Musa* AAA) y Cardaba (*Musa* ABB). Los explantes que utilizaron fueron segmentos de hojas basales y tejido de rizomas. El sistema desarrollado requiere el uso de varios medios de cultivo para el desarrollo de los embriones somáticos y su regeneración en plantas. Su mérito radica en la obtención de 200 a 300 embriones somáticos a partir de un volumen de 0.01 ml de suspensión celular.

A partir de embriones cigóticos inmaduros de *Musa accuminata* ssp. *burmanicoides* y *M. acuminata* ssp. *malaccensis*, Marroquín (1991), logró establecer suspensiones celulares y la regeneración de plantas por embriogénesis somática.

Sannasgala (1989) observó la formación de embriones somáticos *in vitro* a partir de yemas en proliferación de *Musa balbisiana* (BB), en medio líquido agitado, y propuso algunos criterios que permiten diferenciar los embriones somáticos.

Estableció que el origen de los proembriones somáticos globulares es heterogéneo, se originan de las bandas procambiales, de células meristemáticas de la región apical y de células perivasculares. La primera señal del potencial embriogénico es la demarcación de paredes gruesas, en un estado pluricelular; no obstante, no pudo establecer el origen unicelular de los proembriones. También, las células embriogénicas en *Musa* tienen características similares a las descritas en otras plantas: el citoplasma denso, núcleo y nucleolo prominentes y muy pocas vacuolas.

Dhed'a *et al.* (1991 y 1992), obtuvo embriones somáticos del cultivar Bluggoe (*Musa* ABB), utilizando como explantes tejido meristemático de yemas en proliferación (scalps); de ellas derivó suspensiones celulares sin la formación de callos, lo cual es de gran valor en aquellos procedimientos en los que se requiere uniformidad genética.

Escalant *et al.* (1994a y b) obtuvieron embriones somáticos del cultivar Gran Enano (*Musa* AAA), usando como explante manos de flores masculinas. La producción masiva de embriones somáticos fue posible mediante el método de inmersión temporal aplicado a los cultivos embriogénicos.

Este método fue desarrollado por Alvard *et al.* (1993), para la micropropagación de ápices meristemáticos de banano, con resultados satisfactorios en las tasas de propagación y aumento de peso seco de los explantes, evaluados en ciclos de cultivo de 20 días.

La incorporación del método de inmersión temporal al cultivo de suspensiones celulares embriogénicas podría ser un paso importante en la producción masiva de embriones somáticos.

### 3. MATERIALES Y METODOS

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica; en el período comprendido entre agosto de 1993 y diciembre de 1994.

#### 3.1. Cultivares.

Los cultivares que se estudiaron fueron: *Musa* AAA subgrupo Cavendish Cv. Gran Enano, *Musa* AAA subgrupo Gros Michel Cv. Gros Michel y *Musa* AAB subgrupo Plantain Cv. Dominico. El cultivar EMBRAPA 403 (*Musa* AAAB), se usó solamente en el ensayo de dosis de sacarosa y 2,4-D, por falta de material vegetativo. Las inflorescencias de Gran Enano fueron recolectadas en la Finca San Pablo, de la Empresa CORBANA y las de Gros Michel y EMBRAPA 403 en la Finca La Lola, ambas en Siquirres, Limón. Las inflorescencias del cultivar Dominico se recolectaron en fincas de agricultores en los alrededores del Monumento Nacional Guayabo, en Turrialba, Cartago, Costa Rica.

#### 3.2. Desinfección y siembra del explante.

Se cortó la porción apical de la inflorescencia, aproximadamente un tercio del tamaño total de la misma y se eliminaron las brácteas externas de color púrpura. Dentro del laboratorio la inflorescencia se redujo de tamaño hasta 1.5 centímetros lavándola continuamente para remover el látex y evitar la oxidación de los tejidos (Figura 1A).

La desinfección se realizó sumergiendo las inflorescencias previamente reducidas en etanol al 70 % durante cinco minutos y seguidamente se lavaron tres veces en agua destilada estéril. De cada inflorescencia, con ayuda de un bisturí, se aislaron bajo el estereo microscopio diez manitos de flores (Figura 1).

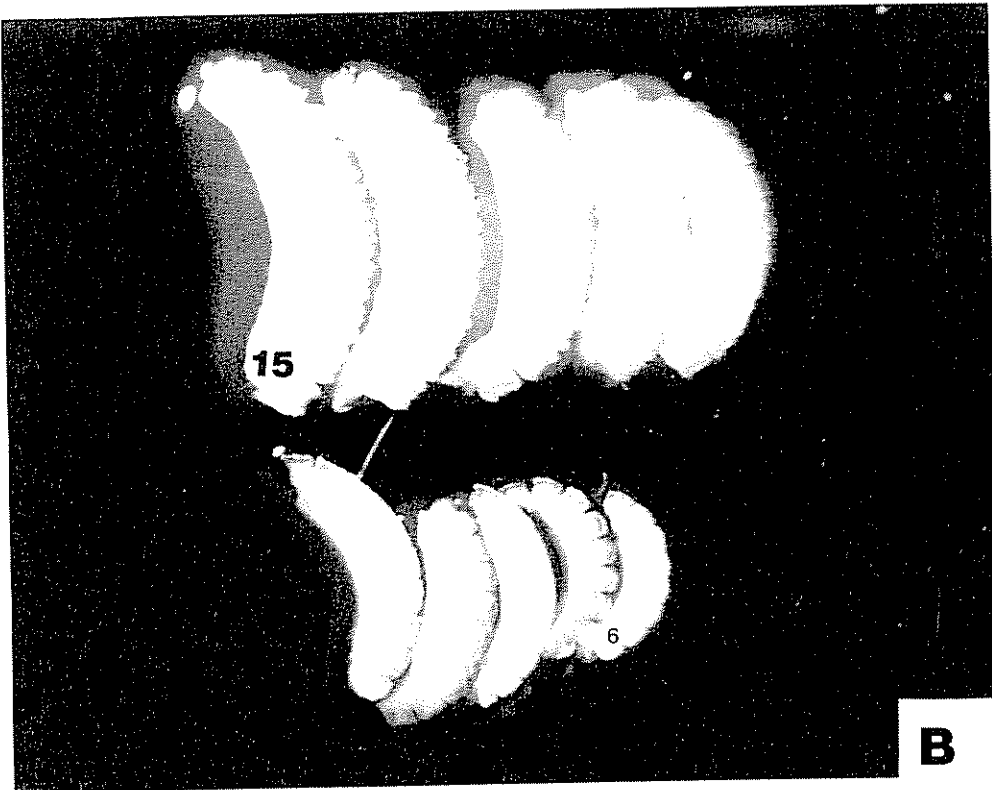
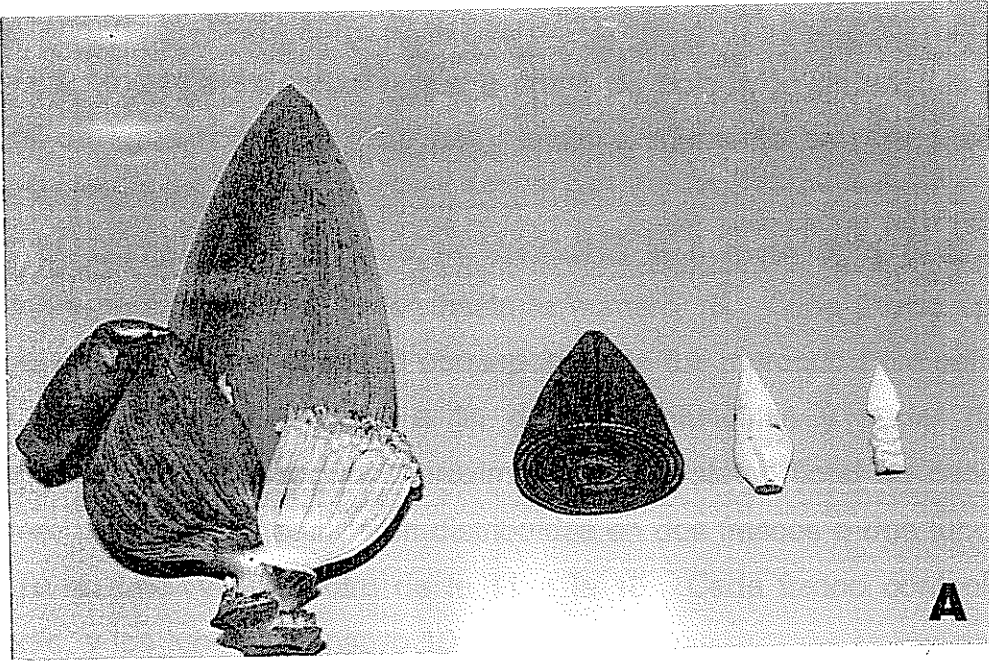


Figura 1. Inflorescencia masculina de las Musáceas.

A. Reducción de la Inflorescencia.

B. Manitos de flores 6 a 15 (9x).

Las manitos se cortaron una a una y se colocaron ordenadamente en una gota de agua sobre un plato petri, hasta el momento en que quedó visible el meristemo floral.

La última manito aislada se consideró la número 6; a partir de ésta se sembraron siguiendo el orden hasta la número 15. Cada frasco tipo Gerber o tubo de ensayo con el medio correspondiente fue marcado para señalar el lugar de cada manito de flores, a fin de no confundirlas y poder diferenciar la respuesta al cultivo según la proximidad al meristemo floral de cada manito de flores. Las manitos estuvieron distribuidas en dos frascos o dos tubos: de la 6 a la 10 en uno, y en el otro de la 11 a la 15. Cada frasco contenía 20 ml de medio, y los tubos de ensayo 10 ml.

### **3.3. Iniciación de callos y cultivos embrionarios:**

El objetivo de éstos ensayos fue obtener cultivos embrionarios a partir de las inflorescencias masculinas jóvenes. Para lograr este objetivo se probaron modificaciones al medio de Ma-1 (Shii *et al.*, 1992), alterando la concentración de sacarosa y 2,4-D (Ensayo 1), complementando el medio de Ma-1 con prolina y zeatina (Ensayo 2); o bien, cambiando el tipo de envase usado (Ensayo 3).

#### **3.3.1. Ensayo 1: Dosis de 2,4-D y sacarosa.**

El objetivo fue determinar la influencia de combinaciones de sacarosa y 2,4-D, sobre la ocurrencia de embriogénesis somática en Musáceas. En dicotiledóneas, la combinación de 120 g/l de sacarosa y 1 mg/l de 2,4-D permitió aumentar la frecuencia de embriogénesis somática (Finner, 1987). Este ensayo fue establecido con el cultivar Gran Enano. Se sembraron 30 inflorescencias por cada tratamiento; de cada inflorescencia se aislaron diez manitos de flores.

El tratamiento control (T1), fue el medio de Ma-1, el cual contiene 4 mg/l de

2,4-D y 30 g/l de sacarosa (Anexo 1). Este medio ha sido usado para la iniciación de callos embriogénicos a partir de inflorescencias masculinas de Musáceas (Shii *et al.*, 1992; Escalant et al., 1994). Los tratamientos 2 al 9 fueron modificaciones al medio Ma-1 únicamente en cuanto se refiere a los niveles de 2,4 -D y sacarosa, de la siguiente forma:

2,4-D (mg/l)	Sacarosa (g/l)		
	30	60	120
4	T1	T4	T7
2	T2	T5	T8
1	T3	T6	T9

### 3.3.2. Ensayo 2: Dosis de prolina y zeatina.

El objetivo fue determinar el efecto de prolina y zeatina sobre la formación de callos friables y cultivos embriogénicos en cultivares de Musáceas. En otras monocotiledoneas se ha establecido que la prolina favorece la formación de callos embriogénicos (Songstad *et al.*, 1992). Así mismo, la zeatina es importante en algunas etapas de la embriogénesis somática (Komamine *et al.*, 1992). Dado que el medio de cultivo usado para el cultivo de inflorescencias masculinas de Musáceas contiene tres auxinas, se decidió incluir en la formulación del medio de Ma-1, una citocinina natural.

El ensayo fue establecido con cuarenta (40) inflorescencias por tratamiento del cultivar Gran Enano y 20 inflorescencias por tratamiento del cultivar Gros Michel. De cada inflorescencia se tomaron diez manitos de flores.

El tratamiento control (T1) fue el medio Ma-1 sin prolina ni zeatina. En los tratamientos 2 al 6 se usó el medio de Ma-1 suplementado con prolina y zeatina como se indica a continuación:

Zeatina(mg/l)	Prolina (mg/l)	
	0	690
0	T1	T4
0,2	T2	T5
1,0	T3	T6

Las manitos de flores cultivadas en los tratamientos con prolina se pasaron a medio de Ma-1 sin prolina a los tres meses de cultivo.

### **3.3.3. Ensayo 3: Tipos de envase y su influencia en el desarrollo de los cultivos.**

El objetivo de este ensayo fue estudiar la posible influencia del tipo de envase sobre la formación de callos friables y cultivos embriogénicos.

Se sembraron cuarenta (40) inflorescencias del cultivar Gran Enano, por cada uno de los tres tipos de envase. De cada una de las inflorescencias se sembraron diez manitos de flores (6 a la 15). Los tratamientos estudiados fueron:

T1	Frascos tipo "Gerber" (vidrio)	5,0 x 9,5 cm
T2	Cajas Magenta (polivinil)	6,5 x 10 cm
T3	Tubos de Ensayo (vidrio)	2,5 x 15 cm

En este ensayo el tratamiento 1 correspondió al control. El medio de cultivo usado en todo el experimento fue el Ma-1 (Anexo 1). En los tubos de ensayo el agar se solidificó en posición inclinada, para disponer de mayor superficie para acomodar las manitos de flores.

### **3.3.4. Diseño experimental y análisis de los resultados.**

En todos los ensayos de iniciación de callos las condiciones de incubación de las manitos de flores fueron las mismas: temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 1000 Lux de iluminación, fotoperíodo de 12 horas luz/oscuridad y 85% de humedad relativa. El diseño experimental en los tres ensayos fue completamente aleatorio. Las evaluaciones del desarrollo de los callos se realizaron a los tres y seis meses de cultivo. Los resultados obtenidos en estos ensayos, expresados como el número de manitos de cada inflorescencia que formaron callo friable (CF) y cultivo embriogénico (CE), se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Conover, 1980).

## **3.4. Estudio de las suspensiones celulares.**

### **3.4.1. Establecimiento y mantenimiento.**

Se establecieron suspensiones celulares de Gran Enano, usando como material inicial callos friables de 3 meses de edad, algunos tenían sobre su superficie embriones somáticos. Los callos fueron obtenidos en medio Ma- 1 semi-sólido, en los ensayos 1, 2 y 3. Las suspensiones se establecieron en cuatro medios de cultivo diferentes: (Anexo 1).

- |                                     |                |
|-------------------------------------|----------------|
| 1. Medio de Ma-2 (Shii et al, 1992) | 3 suspensiones |
| 2. Medio de Ma-2 modificado         | 3 suspensiones |
| 3. Medio Pi 2-30 (Marroquín, 1991)  | 3 suspensiones |
| 4. Medio Ma-1 Pi-2                  | 2 suspensiones |

Las suspensiones fueron iniciadas y mantenidas en 15 ml del medio de cultivo, en frascos de erlenmeyer de 50 ml de capacidad. Cada 15 días se retiró la mitad del medio de cultivo y se añadió igual cantidad de medio fresco.

Para conseguir suspensiones celulares finas se procedió a filtrarlas a través de una malla metálica con poro de tamaño 250, 180 y 125  $\mu\text{m}$ .



Los agregados colectados sobre el filtro de 250  $\mu\text{m}$  se cultivaron en 15 ml de medio para mantenerlas y/o derivar otras suspensiones, mientras que los agregados sobre el filtro de 180 y 125  $\mu\text{m}$  se suspendieron en 3 ml de medio y se cultivaron en pequeños platos de cultivo. El volumen de medio se aumentó de acuerdo al crecimiento de las suspensiones, de 3 a 5, 10 y 15 ml. Cuando las suspensiones se tornaron densas se aumentó el volumen de medio a 30 ml y se cultivaron en erlenmeyers de 250 ml.

Las suspensiones celulares fueron observadas al microscopio periódicamente para anotar el tipo de células que las caracterizaban, así como la presencia de agregados celulares embriogénicos y de células en división. El contenido citoplasmático de las células en suspensión se estudió mediante tinciones con colorantes específicos, tales como Sudán IV para aceites, yodo-yoduro para carbohidratos (CIRAD, 1989) y Fabil para determinar proteínas (Noel, 1964).

También se establecieron suspensiones celulares de Dominico, usando callos blancos friables con embriones somáticos, de cuatro y cinco meses de edad; y de Gros Michel con callos de tres y cuatro meses de edad. Los medios de cultivo usados fueron Ma-2 y N6 (Chu *et al.*, 1975) (Anexo 1). El manejo que se dió a estas suspensiones fue el mismo que se describió antes para suspensiones de Gran Enano. Las condiciones de incubación de todas las suspensiones se describen a continuación: temperatura  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , agitación 70 rpm, iluminación 1000 lux y fotoperíodo de 12 horas luz/oscuridad.

### **3.4.2. Estudio del crecimiento de las suspensiones.**

Se determinó el crecimiento de las suspensiones midiendo el volumen celular por el método de compactación del volumen celular ó PCV (packed cell volume) centrifugando las suspensiones a 2,500 rpm durante 3 minutos para anotar el volumen de células en el volumen total de la suspensión (Reinert y Yeoman, 1982).

### 3.4.3. Germinación de embriones somáticos.

Para la germinación de los embriones somáticos formados en las suspensiones celulares se cultivaron alícuotas de 1 ml de suspensión celular en un medio semi-sólido. Los medios de cultivo fueron el de Germinación y Ma-3 (Shil *et al.*, 1992). En el caso de los embriones formados en suspensiones en medio Ma-3 líquido se tomó el peso y/ o se contaron los embriones germinados para estimar el porcentaje de germinación. El tamaño de los embriones fue medido con un micrómetro ocular calibrado sobre un micrómetro de platina.

En la figura 2 se resume la metodología de trabajo con las suspensiones celulares.

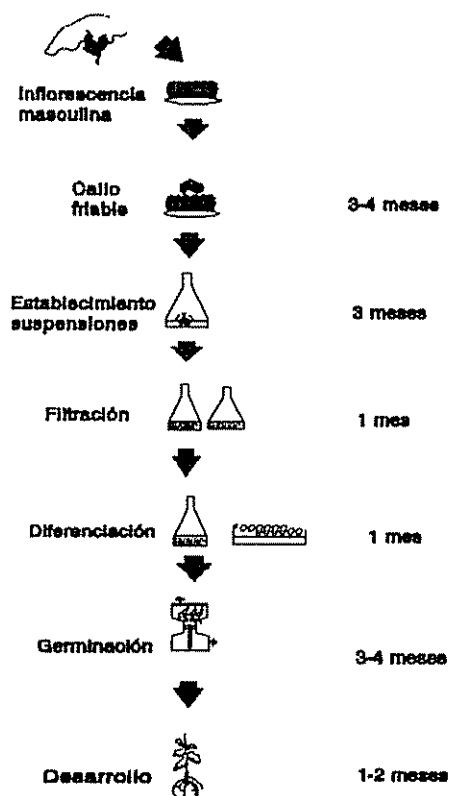


Figura 2. Esquema de trabajo con las suspensiones celulares.

### **3.5. Método de Inmersión Temporal.**

Se establecieron tres cultivos de inmersión temporal del cultivar Dominico, cuatro con el cultivar Gros Michel y uno del cultivar Gran Enano (control).

Este método consiste en sembrar cultivos embriogénicos en filtros Nalgene autoclavables de 250 ó 500 ml de capacidad. El cultivo embriogénico se ubica en la cámara superior y el medio líquido en la inferior. Por medio de un sistema de presión de aire el medio líquido se hace subir para remojar los cultivos. Al quitar la presión del aire el líquido desciende por gravedad. El método fue desarrollado por Alvard *et al.* (1993) para micropropagación de bananos y plátanos y adaptado para el cultivo de embriones somáticos por Escalant *et al.* (1994 a,b). (Anexo 2).

#### **3.5.1. Mantenimiento.**

Los cultivos se iniciaron, preferiblemente, con cultivos embriogénicos o en su ausencia con callos friables que contenían un grupo de embriones somáticos.

El cultivo con el método de inmersión temporal se dividió en dos etapas: una de multiplicación y otra de germinación de los embriones somáticos.

El medio de cultivo para la fase de multiplicación del cultivo embriogénico fue el Ma1- Pi2 (Anexo 1), en cantidad de 100 ml por filtro Nalgene de 250 ml de capacidad. Para la germinación de los embriones somáticos se probaron los medios llamados de Germinación (Marroquín, 1991) y Ma-3 (Anexo 1).

El mantenimiento de los cultivos se llevó a cabo cada 15 días, removiendo el medio circulante y reemplazándolo con medio fresco. Al iniciarse cada sistema de inmersión temporal se anotó el peso de los cultivos y se verificó el aumento del peso a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días.

El régimen de inmersión (el tiempo durante el cual se ejerce la presión del aire) para los cultivos, tanto en multiplicación como en germinación, fue de un (1) minuto cada seis horas, dando un total de cuatro minutos en 24 horas.

### 3.5.2. Germinación de los embriones somáticos.

La germinación de embriones somáticos se inició con 500 mg de cultivo embriogénico o más, pasados a otra unidad de inmersión con el medio de germinación. Pruebas realizadas previamente en el Laboratorio permitieron determinar que el peso de un embrión somático es, aproximadamente 1 mg; por lo tanto, en una muestra de 500 mg de cultivo embriogénico se deberán obtener 500 embriones somáticos. Con base en ésta relación se estimó el porcentaje de germinación.

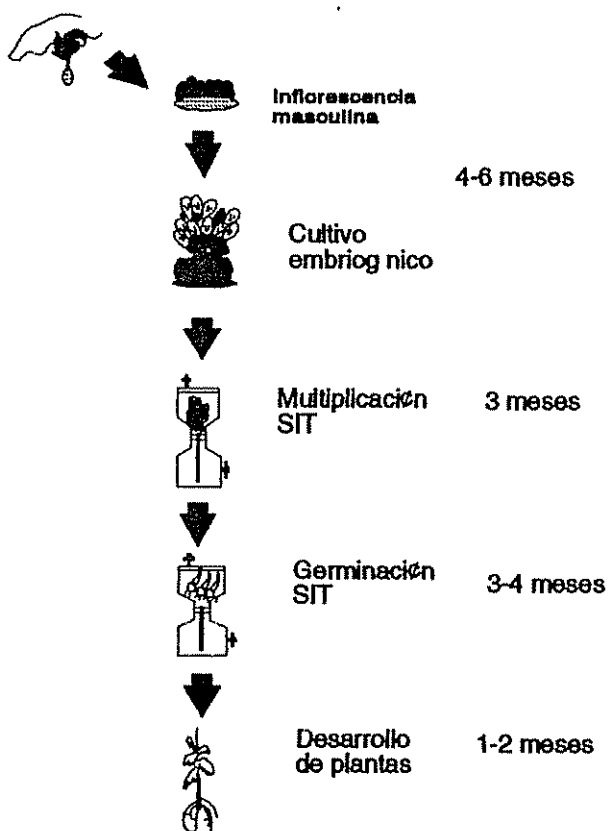


Figura 3. Esquema de cultivo y obtención de plantas por el método de inmersión temporal.

### 3.6. Regeneración de plantas.

Las plantas formadas en el sistema de inmersión temporal y en platos Petri provenientes de las suspensiones celulares fueron pasadas para su crecimiento a tubos de ensayo conteniendo 10 ml de medio de Murashige y Skoog (1962), sin reguladores (Anexo 1).

### 3.7. Estudios histológicos:

Con el fin de describir el proceso embriogénico a partir de las manos de flores masculinas en las Musáceas se realizaron estudios histológicos de caracterización de las manos de flores masculinas. Para ello se estudiaron las manitos de flores masculinas del rango 6, 8, 10, 12 y 14 del cultivar Gran Enano, sin cultivar y manitos de flores de un mes en cultivo *in vitro* sobre medio de Ma-1.

El desarrollo de los callos embriogénicos se estudió en manitos cultivadas de 2, 3, 4, 5 y 6 meses sobre medio de Ma-1. Para evitar la disgregación de los callos y cultivos, éstos fueron colocados en bloques de agar-agua al 1 %, antes de procesarlos.

Se utilizaron las técnicas convencionales de infiltración en parafina: (Anexo 3).

- fijación en formalina-alcohol-ácido acético por 48 horas
- deshidratación en serie ascendente de alcohol
- infiltración en parafina
- cortes en microtomo (9  $\mu$ )
- desparafinación
- coloración en safranina, cristal violeta, fast green y orange G.

## 4. RESULTADOS y DISCUSION

### 4.1. Iniciación de callos y cultivos embriogénicos.

#### 4.1.1. Ensayo de Dosis de sacarosa y 2,4-D.

##### 4.1.1.1. Respuesta de los explantes Cv. "Gran Enano".

En el primer mes de cultivo los explantes aumentaron de tamaño en los tratamientos con 30 y 60 g/l de sacarosa. Durante el segundo mes comenzaron a aparecer callos amarillos y en algunos casos pequeños callos blancos. En el tercer mes se encontraron los callos amarillos redondos, como nódulos, sobre los cuales se desarrolló un pequeño callo blanco friable (CF), con o sin embriones somáticos. Los embriones somáticos se desdiferenciaron en un callo blanco friable, o bien, maduraron y se oxidaron conforme envejeció el tejido que los originó. Los cultivos embriogénicos (CE) aparecieron entre el cuarto y sexto mes de cultivo. Escalant *et al.* (1994a), encontraron la misma secuencia de desarrollo de los cultivos embriogénicos en el cultivar Gran Enano: callo amarillo - callo blanco friable - embriones somáticos.

Los callos friables (CF) son de color blanco- crema, de textura suave (friable), que pueden tener o no en su superficie uno o un pequeño grupo de embriones somáticos. Es un callo que se disgrega fácilmente.

Los cultivos embriogénicos (CE) son suaves, de color blanco-crema, en la superficie llevan una gran cantidad de embriones somáticos. En algunos casos el cultivo embriogénico se diferencia en una pequeña área del callo friable. Este cultivo tiene la capacidad de formar un gran número de embriones somáticos de forma continua, de manera que puede contener embriones en diferentes estados de desarrollo. (Figura 4).

En el Cuadro 1 se resume la respuesta de los explantes en los diferentes tratamientos. La respuesta más frecuente en los tratamientos con 30 y 60 g/l de sacarosa, fue la formación de callos amarillos (16,7 % de todas las manitos sembradas).

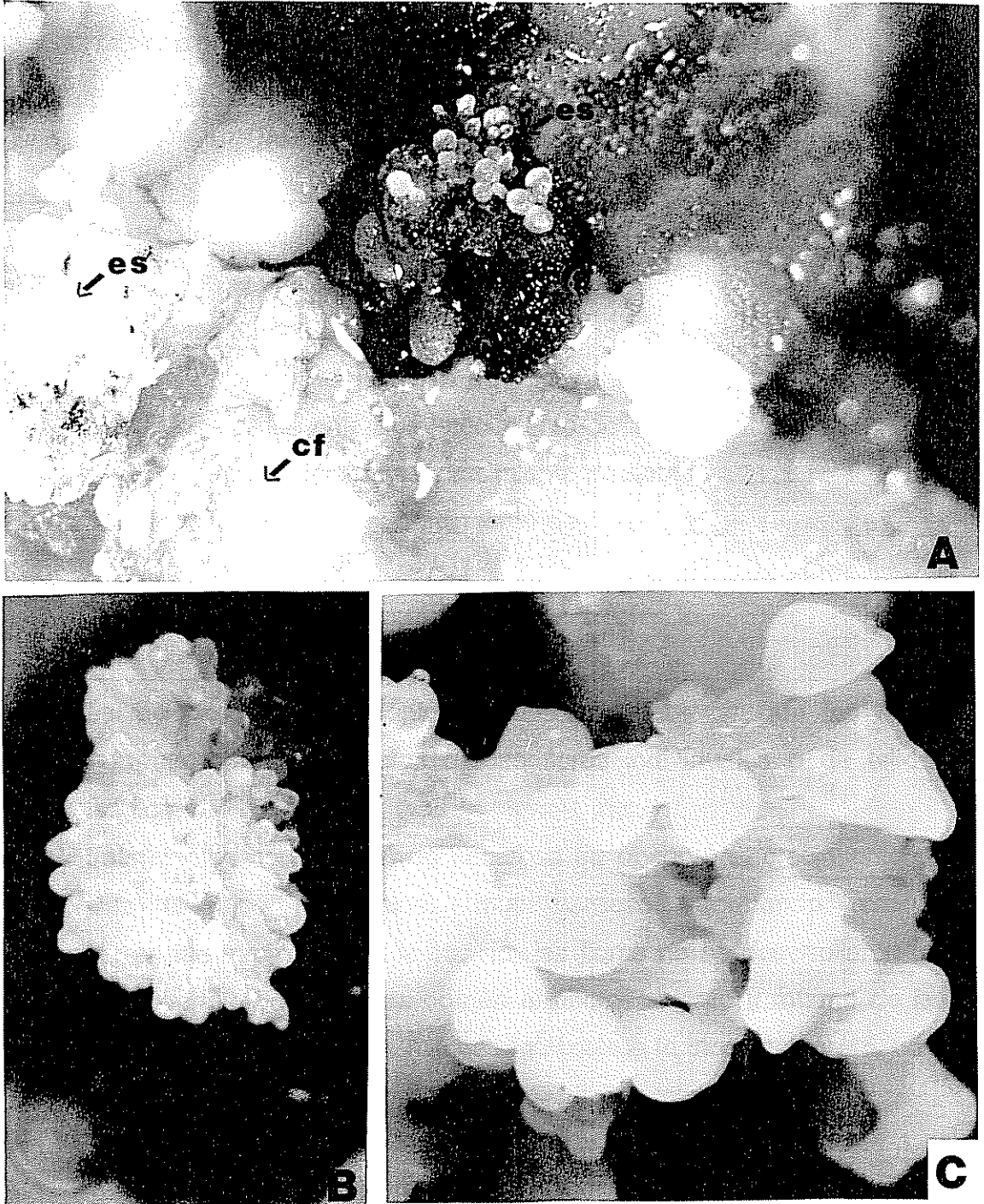


Figura 4. Callos friables y cultivos embriogénicos.

A. Callo friable (cf) con grupos de embriones somáticos (es). (6x).

B. Cultivo embriogénico (12x)

C. Detalle del desarrollo de embriones somáticos (12x).

Cuadro 1. Respuesta de los explantes a los tratamientos con 2,4-D y sacarosa. Cultivar Gran Enano.

Trat.	Sac	2,4-D	Descripción cualitativa
T1	30	4	Callos amarillos, CF, CE.
T2	30	2	Callos amarillos, CF, CE.
T3	30	1	Callos amarillos, CF.
T4	60	4	Callos amarillos, necrosis de pocas manitas
T5	60	2	Pocos callos amarillos, crecimiento de flores
T6	60	1	Pocos callos amarillos, crecimiento de flores
T7	120	4	Manitas necróticas, crecimiento de flores
T8	120	2	Similar al T7
T9	120	1	Muchas manitos necróticas, flores creciendo.

Las observaciones al microscopio permitieron establecer que los callos amarillos se formaron en los pétalos de las flores individuales o de tejidos internos de las flores.

En los tratamientos con 120 g/l de sacarosa se observó el crecimiento de partes florales (sépalos y pétalos), muy carnosos, formando rosetas, principalmente en las manitos 11 a la 15. En las flores no se desarrollaron los estambres ni el ovario. También fue común el necrosamiento y muerte de las manitos del rango 6 a 10 en los tres meses siguientes a la inoculación (45, 35 y 54 % de manitos muertas, para los tratamientos 7, 8 y 9, respectivamente).

Para el análisis estadístico se consideraron solamente los tratamientos 1 al 6, debido a que en los tratamientos 7, 8 y 9 no se encontró respuesta de los explantes.

Hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos en cuanto a la formación de callos friables ( $p = 0,0001$ ), pero no para cultivos embrilogénicos. En los tratamientos 1 y 3 el 16,6 % de la manitos sembradas produjeron callos friables,



y en el T2 el 12,7%. En los tratamientos 4, 5 y 6 se formaron CF en menor porcentaje (4,6 ; 3,3 y 1,6 %; respectivamente). (Cuadro 2).

Los cultivos embriogénicos sólo se formaron en los tratamientos 1 y 2, en muy bajo porcentaje (0,6 y 0,3 %). Estos resultados son bajos, en comparación con el 37 % de inflorescencias cultivadas de Gran Enano que formaron cultivos embriogénicos en medio Ma-1, según informó Escalant *et al.* (1994 a); éstos autores encontraron una influencia estacional en la respuesta de los explantes al cultivo *in vitro*. Es importante destacar que éste ensayo se estableció en febrero (estación seca), mes durante el cual la respuesta embriogénica es baja, tal vez por influencia del estado fisiológico de la planta madre.

Cuadro 2. Porcentaje de manitos que formaron Callos Friables y Cultivos Embriogénicos en los tratamientos con sacarosa y 2,4-D. Cv. Gran Enano.

2,4-D	S A C A R O S A					
	30		60		120	
	CF	CE	CF	CE	CF	CE
4	16,6	0,6	4,6	0	0	0
2	12,7	0,3	3,3	0	0	0
1	16,6	0,0	1,6	0	0	0

Los mejores resultados en este ensayo se obtuvieron con el tratamiento control (4 mg de 2,4-D y 30 g de sacarosa); cuando se se aumentó la dosis de sacarosa y se disminuyó el 2,4-D en el medio no se obtuvieron CF ni CE, al contrario de lo hallado por Finner (1987), en el cultivo de embriones cigóticos inmaduros de girasol, quien encontró el mayor porcentaje de formación de embriones somáticos con 1 mg/l de 2,4-D y 120 g de sacarosa.

#### 4.1.1.2. Efecto de la sacarosa.

Los niveles de sacarosa tuvieron una respuesta lineal negativa en la producción de cultivos embriogénicos, y fue significativa para CF ( $p = 0,0001$ ).

La mayor cantidad de CF y CE se obtuvo en los tratamientos con 30 g de sacarosa (139 y 3), y disminuyó en los tratamientos con 60 g de sacarosa. Hubo diferencias significativas ( $p = 0,05$ ) entre las dosis de 30 y 60 g/l de sacarosa. Con el nivel de 120 g no se formaron callos friables ni cultivos embriogénicos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la sacarosa en la formación de Callos Friables y Cultivos Embriogénicos. Cv. Gran Enano.

Niveles (g/l)	Número de		Porcentaje	
	CF	CE	CF	CE
30	139	3	15,4	0,3
60	29	0	3,2	0,0
120	0	0	0,0	0,0

Al contrario de los resultados obtenidos en Musáceas, donde la embriogénesis somática es favorecida por dosis bajas de sacarosa (3 %), en dicotiledóneas se necesitan concentraciones mayores para inducir una respuesta embriogénica: 6% en maní (Eapen y George, 1993), 12 % en *Helianthus annuus* (Finner, 1987), 12- 18% en *Dendranthema grandiflora* (May y Trigiano, 1991). Estos últimos autores señalan que la concentración de sacarosa reguló las rutas de desarrollo de los explantes: 3 y 6 % de sacarosa conllevaron a la organogénesis y dosis de 12 a 18 % condujeron a la embriogénesis somática. La expresión de la embriogénesis en medio con alta

concentración de sacarosa la relacionan con un efecto osmótico antes que con un requerimiento nutricional. Eapen y George (1993), encontraron que dosis de 7 a 10 % de sacarosa inhibieron la embriogénesis somática en maní.

#### 4.1.1.3. Efecto del 2,4-D

Se observó la formación de CF con las tres dosis de 2,4 -D probadas; sin embargo, no hubo diferencias entre éstas. La formación de CE fue muy baja. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del 2,4- D en la formación de Callos Friables y Cultivos Embriogénicos. Cv. Gran Enano.

Niveles (mg/l)	Número de		Porcentaje	
	CF	CE	CF	CE
4	64	2	7,1	0,2
2	49	1	5,4	0,1
1	55	0	6,1	0,0

En el cultivo de inflorescencias de *Poa pratensis* se logró la formación de embriones somáticos usando el medio de cultivo MS suplementado con 2 mg/l de 2,4-D y 30 g/l de sacarosa (Van der Valk *et al*, 1989); mientras que la respuesta embriogénica en maní ocurre con más alta frecuencia utilizando dosis de 20 y 10 mg de 2,4-D (Eapen y George, 1993). En Cucurbitáceas se encontró que el modo de regeneración está en dependencia de la concentración de 2,4-D: altas concentraciones conducen a la embriogénesis somática y bajas a callogénesis (Debeaujon y Branchard, 1993). Al parecer, la respuesta al 2,4-D varía de un cultivo a otro.

#### 4.1.1.4. Resultados con otros cultivares.

Los cultivares EMBRAPA 403, Dominico y Gros Michel fueron cultivados en los tratamientos 1, 2, 3, 5 y 9 del ensayo de dosis de 2,4-D y sacarosa; debido a la disponibilidad del material vegetativo no fue posible establecer el ensayo completo. La respuesta de los explantes a los tratamientos fue similar a la descrita para el Cv. Gran Enano, con bajos porcentajes de formación de CF y CE. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias entre cultivares ni entre tratamientos para las dos variables de interés. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de manitos que formaron Callos Friables y Cultivos Embrlogénicos en los cultivares EMBRAPA 403, Dominico y Gros Michel.

TRAT	EMBRAPA-403		DOMINICO		GROS MICHEL	
	CF	CE	CF	CE	CF	CE
1	0,62	1,25	0	0	2,0	0
2	5,00	0	2,3	0	1,0	1,5
3	2,50	0	0,95	0,95	1,57	0,52
5	0,76	0	0,27	0,27	0	0
9	0	0	0	0	0	0

Estos resultados confirman el potencial de las inflorescencias masculinas como explante inicial para el desarrollo de la embrilogénesis somática en cultivares pertenecientes a distintos grupos genómicos, como los aquí utilizados, abriendo una nueva posibilidad para el mejoramiento genético de triploides AAA y AAB, y de tetraploides. Cabe destacar que el Gros Michel y Dominico son consumidos localmente en Centro América; mientras que EMBRAPA-403 (*Musa* AAAB) es un tetraploide sintético, producto del cruce de Prata (*Musa* AAB) x

Calcuta-4 (*Musa AA*), desarrollado por el Programa de Mejoramiento Genético de EMBRAPA en Cruz das Almas, Brasil. Este tetraploide, con resistencia a Sigatoka Negra, está en evaluación en diferentes lugares de América Latina.

#### **4.1.2. Ensayo 2. Dosis de prolina y zeatina. Cv. Gran Enano.**

##### **4.1.2.1. Respuesta de los explantes a la zeatina y prolina.**

Los explantes cultivados en los tratamientos que contenían zeatina en dosis de 0,2 mg/l (T2 y T5), formaron muchos callos amarillos y algunos de color verde y apariencia acuosa, debajo de los cuales se encontraron algunos cultivos embriogénicos. Los CE formados en el tratamiento 5 (0,2 mg zeatina y 690 mg prolina) tenían una consistencia más dura que aquellos formados en los otros tratamientos.

En los tratamientos con 1,0 mg/l de zeatina (T3 y T6) también se formaron callos de color verde, en algunos casos hubo crecimiento de estructuras florales.

El tratamiento 4 (0 zeatina, 690 mg prolina) causó necrosis de algunos explantes en los primeros tres meses de cultivo, en los otros tratamientos con prolina (T5 y T6) no se encontró necrosis de las manitos de flores. Todas las manitos cultivadas en los tratamientos con 690 mg de prolina (T4, T5 y T6) se transfirieron a medio de Ma-1 (testigo) a los tres meses, donde se formaron los cultivos embriogénicos.

Hubo diferencias significativas ( $p = 0,0001$ ) entre los tratamientos para la formación de CF; sin embargo, para CE no se encontraron diferencias. El mejor tratamiento para la formación de CF fue el T2 (zeatina 0,2 y prolina 0). En los tratamientos sin prolina (T1, T2 y T3) la formación de CF fue mayor, mientras que en los tratamientos con prolina (T4, T5 y T6) fue mayor la formación de CE. Con el tratamiento 4 (0 zeatina + 690 prolina), se obtuvo la mayor cantidad de CE. Los resultados se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Porcentaje de manitos que formaron Callos Friables y Cultivos Embriogénicos en los tratamientos con prolina y zeatina. Cv. Gran Enano.

Zeatina mg	Prolina (mg)			
	0		690	
	CF	CE	CF	CE
0	4,7	0,25	3,5	1,75
0,2	16,5	0,50	6,5	0,50
1,0	10,0	0,75	3,7	1,0

#### 4.1.2.2. Efecto de la zeatina en la formación de callos.

En la formación de CF la respuesta de los explantes a la zeatina fue significativa ( $p = 0,0001$ ). La mayor cantidad de CF (92) se obtuvo con 0,2 mg/l de zeatina, y disminuyó cuando se usó 1 mg/l (55). La formación de CE fue mayor (8 CE) en los tratamientos sin zeatina (0 mg). (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de la zeatina en la formación de CF y CE. Cv. Gran Enano.

Niveles mg/l	Número de		Porcentaje	
	CF	CE	CF	CE
0	33	8	4,1	1,0
0,2	92	4	11,5	0,5
1,0	55	7	6,8	0,8

Según Komamine *et al.* (1992), la zeatina tiene un efecto promotor en la embriogénesis somática, en cualquier fase, pero éste es más acentuado en la

fase 2, en la cual ocurre la división celular activa, previa a la formación de embriones globulares. La zeatina añadida al medio de cultivo que contenía 2,4 - D, en concentración de 0.5  $\mu$ M (0.1 mg/l) aumentó ligeramente la frecuencia de respuesta embriogénica en explantes de maní, aunque no aumentó el número promedio de embriones somáticos por explante (Eapen y George, 1993). Sin embargo, en el cultivo de inflorescencias masculinas de musáceas, la zeatina añadida al medio con auxinas promovió la formación de callos friables pero no de cultivos embriogénicos.

#### 4.1.2.3. Efecto de la prolina .

La ausencia de prolina (0 mg) en el medio de cultivo favoreció la formación de CF ( $p = 0,0001$ ). La inducción de CE fue mayor en los tratamientos con prolina (690 mg), pero las diferencias no fueron significativas. (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de la prolina en la formación de CF y CE. Cv. Gran Enano.

Niveles mg/l	Número de		Porcentaje	
	CF	CE	CF	CE
0	124	6	10,3	0,5
690	55	13	4,5	1,1

Songstad *et al* (1992), encontraron que la prolina, en dosis de 25 mM (2,875 g), favoreció la formación de callos friables embriogénicos, utilizando como explantes inflorescencias masculinas inmaduras de maíz. Claparols *et al* (1993), probaron dosis de 6, 12, 24 y 48 mM de prolina sobre callos compactos de maíz, obteniendo la mayor formación de callos embriogénicos con 6 mM (690 mg), mientras que a concentraciones mayores y con prolina 0 hubo reducción de la respuesta embriogénica. También Armstrong y Green (1985), notaron un

aumento en la formación de callos embriogénicos de maíz con 6 mM de prolina.

La interacción zeatina-prolina fue significativa sólo para la inducción de callo friable ( $p = 0,076$ ), que fue mayor con 0,2 mg/l de zeatina con o sin prolina (T2 y T5). La interacción de estas dos sustancias no favoreció la formación de CE, que fue mayor cuando se usó sólo una en el medio de cultivo.

#### 4.1.2.4. Ensayo 2. Cultivar Gros Michel.

La respuesta cualitativa fue similar a la observada en el cultivar Gran Enano. El Cuadro 9 presenta la respuesta de las manitos de flores al cultivo en medio con zeatina y prolina.

Cuadro 9. Porcentaje de manitos que formaron Callos Friables y Cultivos Embriogénicos en los tratamientos con prolina y zeatina. Cv. Gros Michel.

Zeatina	P R O L I N A			
	0		690	
	CF	CE	CF	CE
0	0,5	0	0,5	0,5
0.2	6,5	1,5	1,0	1,,0
1.0	4,0	3,0	0,5	0

Los tratamientos estudiados tuvieron poca influencia sobre la formación de CE; pero fueron significativos para CF ( $p=0,0015$ ).

Tanto la zeatina como la prolina tuvieron un efecto significativo en la inducción de CF ( $p= 0,0296$  y  $p= 0,0032$ ; respectivamente). La dosis de 0,2 mg/l de zeatina favoreció ligeramente la formación de ambos (Cuadro 10).



Cuadro 10. Efecto de la zeatina en la formación de CF y CE. Cv. Gros Michel.

Niveles mg/l	Número de		Porcentaje	
	CF	CE	CF	CE
0	2	1	0,50	0,25
0,2	15	5	3,75	1,25
1,0	9	5	2,25	1,25

La prolina (690 mg/l) no fue importante para la formación de callos y cultivos embriogénicos de Gros Michel (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto de la prolina en la formación de CF y CE. Cv. Gros Michel.

Niveles mg/l	Número de		Porcentaje	
	CF	CE	CF	CE
0	22	8	3,6	1,3
690	4	3	0,6	0,5

Para ambos cultivares, Gran Enano y Gros Michel, la formación de callos friables parece ser favorecida por la presencia de zeatina. En cuanto a la presencia de prolina en el medio de cultivo, el comportamiento de estos dos cultivares es diferente. Así, la formación de CE en el Cv. Gran Enano fue favorecida por la prolina a 690 mg/l en ausencia de zeatina. Al contrario, para el Gros Michel, el número de CE fue mayor en presencia de zeatina y ausencia de prolina.

### 4.1.3. Ensayo de tipos de envase.

El crecimiento en los tres tipos de envases probados fue similar, con la única diferencia de que los CE formados en el T3 (tubos de ensayo) presentaron un color amarillo, en contraste con los usualmente obtenidos en frascos Gerber que son de color blanco-crema. La manipulación de los explantes fue menos cómoda en los tubos de ensayo, aún cuando éstos tienen la ventaja de que ocupan menos espacio.

Los envases Magenta tienen el inconveniente de que ocupan más espacio durante la incubación y también un área de exposición al aire mayor que los hace más susceptibles a la desecación de los explantes y del medio y a la contaminación.

Hubo diferencias significativas entre los diferentes envases en cuanto a la formación de CF ( $p = 0,0528$ ). El envase frasco Gerber (control) presentó la mayor cantidad de CF (39) y fue diferente de los otros dos tratamientos. La mayor cantidad de CE (3) se formó en los tubos de ensayo, aunque no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos.

Adkins *et al.* (1993), basados en su experiencia con cultivos de arroz, argumentan que los envases de cultivo grandes que diluyen el etileno y proveen más oxígeno son mejores que los envases pequeños cuando los cultivos deben ser cerrados e incubados por largos períodos. Los envases grandes (2-3 cm<sup>3</sup> de espacio gaseoso por mg de peso fresco) proporcionaron un aumento de 4 veces en el crecimiento de los cultivos de arroz, comparados con envases pequeños (1 cm<sup>3</sup> de espacio por mg de peso fresco).

La diferencia en la cantidad de CF y CE que se forma en los diferentes tipos de envase puede estar influenciada por la disponibilidad de nutrientes y por las condiciones del ambiente gaseoso, dependiendo ambas del tamaño del envase utilizado. Es posible que algunos envases de plástico, como las cajas Magenta y las tapas de plástico, frecuentemente utilizados, puedan formar etileno y afectar el desarrollo de los cultivos.

#### **4.1.4. Respuesta de las manitos de flores de acuerdo a su posición .**

En general, la formación de CF estuvo concentrada en las manitos del rango 9 a 13, y los CE entre las manitos 8 a la 12 (Figura 5).

Las manitos de flores que más reaccionaron a los tratamientos del Ensayo 1 fueron las del rango 10 y 11, de las cuales se formó el 37,7 % de los callos friables. Los tres CE que se produjeron correspondieron a la manito 10.

En el Ensayo 2 las manitos 9 y 10 dieron origen a la mayor cantidad de CF (36,4 %), y los CE se formaron de las manitos 8 a la 14, principalmente de las manitos 8 y 10 (47,3 %).

Las manitos 12 y 13 formaron el 41,3 % de los CF del ensayo 3. Los CE estuvieron distribuidos entre las manitos 7 a la 12, correspondiendo a la manito 11 el 33 % .

En los tres ensayos de iniciación de CF y CE se cultivaron en total 630 inflorescencias masculinas del Cv. Gran Enano, dando un total de 6300 manitos de flores. De éstas, 423 manitos respondieron formando CF y sólo 28 manitos formaron CE. La respuesta puede ser explicada por los tratamientos probados y, posiblemente, por la influencia estacional reportada por Escalant *et al.* (1994a), ya que estos ensayos fueron instalados en los meses de enero a marzo, en los cuales los mencionados autores encontraron una baja respuesta.

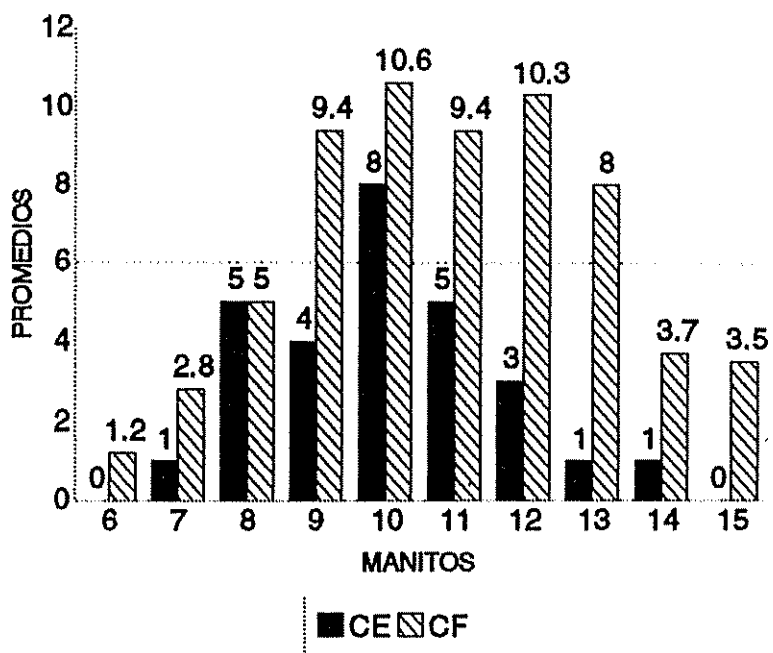


Figura 5. Respuesta de las manitas de flores según su posición.

## **4.2. Suspensiones Celulares.**

### **4.2.1. Tipos de células y contenido citoplasmático.**

Las suspensiones están formadas por células esféricas, pequeñas, con contenido citoplasmático denso, individuales o formando agregados celulares y por otras células de forma alargada irregular y de apariencia vacía. A los veinte días de iniciado el cultivo de las suspensiones ya se podía distinguir en ellas agregados embriogénicos, los que en su totalidad estaban formados por el primer tipo de células mencionado. Las células esféricas mostraron contenido de almidón y proteínas, algunas contenían lípidos. En las células de forma alargada fue evidente sólo el contenido de almidón. También los agregados celulares y los embriones globulares que había en las suspensiones de Dominico, Gran Enano y Gros Michel mostraron contenido de proteínas en el citoplasma cuando se tiñeron con Fabil.

Las características celulares mencionadas y la presencia de sustancias de reserva (almidón, proteínas y lípidos) en el citoplasma de las células en suspensión se considera como un indicativo de su condición embriogénica (Williams y Maheswaran, 1986). Estudios en suspensiones celulares de Musáceas han confirmado la presencia de cuerpos proteícos y almidón en las células de proembriones (Sannasgala, 1989), y proteínas de reserva en células de callos embriogénicos (Escalant y Teisson, 1989). También, en las suspensiones que comenzaron a degenerarse se observaron agregados celulares grandes, en los cuales el contenido citoplasmático fue, principalmente, almidón.

## **4.2.2. Respuesta a los medios de cultivo.**

### **4.2.2.1. Cultivar Dominico.**

Las suspensiones de Dominico cultivadas en medio Ma-2 y N-6, fueron establecidas con CF que tenían embriones somáticos.

El medio de Ma-2 permitió el aumento en el volumen celular y la formación de agregados celulares embriogénicos en todas las suspensiones. En general, todas las suspensiones tenían un color amarillo claro, excepto en los casos en que se presentó oxidación.

En el medio de N-6 hubo un crecimiento celular profuso, con predominio de células individuales esféricas y formación de agregados embriogénicos, acompañado de la acumulación de gran cantidad de almidón. En este medio las suspensiones adquirieron una consistencia espesa, que estuvo en dependencia de la relación volumen de células/ volumen del medio, normalizándose ésta situación cuando se aumentó el volumen del medio para mantener una relación de 1 ml de células en 15 ml de medio de cultivo.

### **4.2.2.2. Cultivar Gros Michel.**

Se establecieron nueve suspensiones celulares de Gros Michel utilizando CF que contenían embriones somáticos, en medio Ma-2. Entre las suspensiones hubo diferencias en el tipo de células, formación de agregados celulares y crecimiento de callos. De las 9 suspensiones establecidas, ocho se perdieron a los cuatro meses por oxidación; no obstante, se logró la diferenciación de embriones somáticos de la suspensión GM9.

#### **4.2.2.3. Cultivar Gran Enano.**

Las suspensiones celulares de Gran Enano (11) se establecieron en cuatro medios de cultivo diferentes, usando callos friables embriogénicos.

El desarrollo de las suspensiones de Gran Enano fue mejor en los medios de cultivo Ma-2 y Ma-1 Pi-2.

En el medio Ma-2 se observaron células embriogénicas, esféricas, pequeñas, con contenido citoplasmático denso. Hubo gran cantidad de células en división, agregados celulares y pro-embriones de 4 a 8 células, que evolucionaron hasta formar embriones somáticos (Figura 6). Las células en división contenían almidón y también proteínas en el citoplasma; en algunas células se encontraron lípidos. Las tres suspensiones establecidas en este medio mostraron diferencias en cuanto a la cantidad de células, agregados embriogénicos, crecimiento de callos, presencia o ausencia de oxidación por fenoles.

En el medio Ma-2 modificado hubo células en división pero en menor cantidad y agregados celulares más pequeños en comparación con aquellos del medio Ma-2. En este medio se observó muchas células alargadas, no embriogénicas.

El medio Pi- 2-30 propició el crecimiento de callos blancos compactos. Las suspensiones estaban formadas por células esféricas pequeñas y células alargadas, predominando las últimas. Casi no se observó división celular ni células embriogénicas. El citoplasma de las células contenía almidón.

En el medio Ma-1 Pi-2 se desarrollaron células esféricas, pequeñas, con contenido citoplasmático denso, hubo muchas células en división, agregados celulares y proembriones. Hacia el cuarto mes de cultivo fue notable la formación de embriones somáticos en las dos suspensiones.

Cuadro 12. Características de las suspensiones del Cultivar Gran Enano, cultivadas en cuatro medios diferentes.

Medio de cultivo	Características de las suspensiones
Ma-2	Células embriogénicas, agregados celulares, proembriones, embriones somáticos (6 meses)
Ma-2 mod.	Células embriogénicas y no embriogénicas, agregados celulares
Pi-2-30	Callos blancos compactos, células no embriogénicas
Ma-1 Pi-2	Células embriogénicas, agregados celulares, proembriones, embriones somáticos (4 meses)

Posiblemente, las diferencias en las respuestas puedan ser explicadas por las diferencias en la composición de los medios de cultivo. Los medios Ma-2 y Ma-2 modificado difieren únicamente en la auxina: 2,4-D y picloram, en concentración de 1 mg/l, respectivamente, ambos medios contienen glutamina y extracto de malta, que representan fuentes de aminoácidos y se utilizan con pH de 5.3. Los medios Pi-2-30 y Ma-1 Pi-2 ambos contienen 2 mg/l de picloram, pero difieren en que el medio Ma-1 Pi-2 contiene, además, ANA y AIA en concentración de 1 mg/l.

Las diferencias observadas entre las suspensiones cultivadas en un mismo medio pueden deberse a diferencias en la capacidad embriogénica del callo friable utilizado para establecerlas, ya que las condiciones de cultivo y mantenimiento fueron iguales.

Las suspensiones cultivadas en medio de Ma-2 Cvs. Dominico y Gran Enano y en Ma-1 Pi-2 del Cv. Gran Enano mantuvieron su capacidad embriogénica por más de seis meses, inclusive después de haberse filtrado varias veces las suspensiones originales.



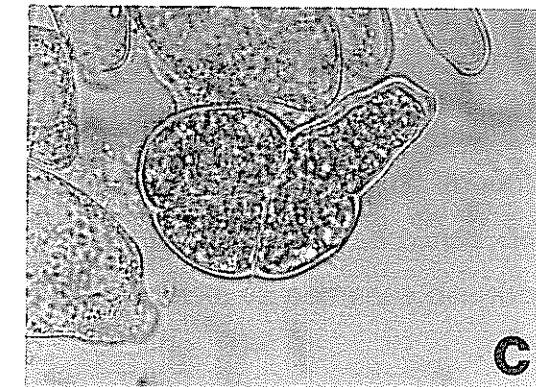
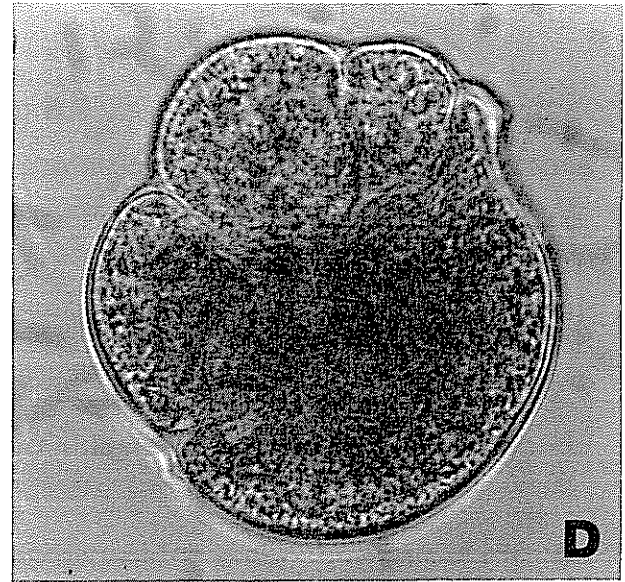
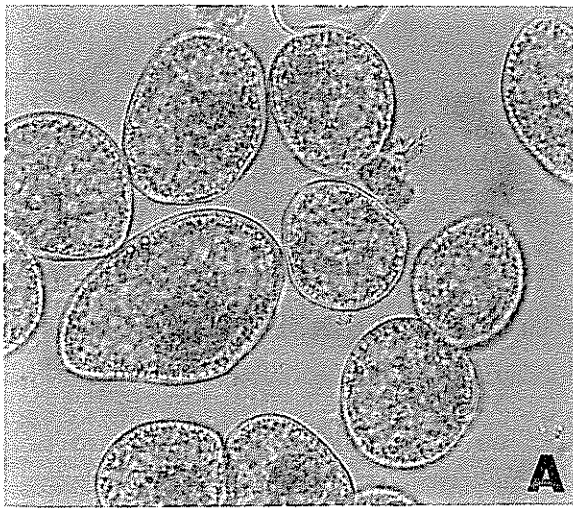


Figura 6. Etapas en el desarrollo de una suspensión embrionaria.

A. Células embrionarias (40x) B. Células en división (40x)

C y D. Proembriones (10x, 5x) E. Embriones somáticos (4x).

### 4.2.3. Suspensiones celulares finas.

Las suspensiones finas formadas por células, agregados celulares y proembriones retenidos sobre filtros de 180  $\mu\text{m}$  se obtuvieron de las suspensiones 5, 11, 12, 13; y sobre filtro de 125  $\mu\text{m}$  de las suspensiones 8 y 11 de Dominico. Estos filtrados fueron cultivados en medio de Ma-2. También se derivaron suspensiones finas de Gran Enano y Gros Michel con filtro de 125  $\mu\text{m}$ . Las suspensiones finas se cultivaron en el mismo medio de cultivo que se usó para las suspensiones originales y se observó una respuesta similar al medio de cultivo.

Las suspensiones finas conservaron su capacidad embrilogénica por más de seis meses en el caso del Cv. Dominico, siendo evidente la formación de embriones somáticos entre la semana 24 y 26 de cultivo en las suspensiones D8, D11 y D12. En las suspensiones finas de Gran Enano G10 y G11 en medio Ma-1 Pi-2 ocurrió la formación de embriones somáticos a los cuatro meses, similar a lo encontrado en las suspensiones originales.

Frecuentemente, los cultivos de suspensiones finas se oxidaron en los 15 días siguientes al inicio, observándose la presencia de fenoles en las células, los que posiblemente causaron el ennegrecimiento y muerte de las mismas.

Fue más rápida la diferenciación de embriones en medio Ma-3 que en el medio Ma-2 o Ma-1 Pi-2.

En ensayos con suspensiones celulares de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* Marroquín (1991), encontró que la formación de embriones ocurrió entre la tercera y cuarta semanas después de filtradas las suspensiones y en otros casos hasta 12 semanas después.

#### 4.2.4. Medición del volumen celular.

Las suspensiones tuvieron al inicio una fase de latencia, que fue más prolongada para unas que para otras; seguida de la fase de crecimiento exponencial, durante la cual ocurrió la división celular activa y aumentó el volumen de células. Esta fue seguida de las fases estacionaria y de decrecimiento.

En general, las suspensiones tuvieron un crecimiento continuo, con algunos decrecimientos (D8-N6, D11, GE11), causados posiblemente por la alta densidad celular alcanzada en 15 ml de suspensión. La relación volumen de células/ volumen de medio óptima que permite el crecimiento de las suspensiones se estima que es 1 ml de células/ 15 ml de medio. Cuando ésta relación se alteró se observó una disminución del crecimiento de las suspensiones y aumento en la viscosidad, siendo necesario aumentar el volumen total a 30 ml o fraccionar el volumen celular en dos suspensiones. Con ésto se logró reiniciar el crecimiento y mantenerlo.

La medición del volumen celular se realizó en los filtrados de las suspensiones (180 y 125  $\mu\text{m}$ ), en algunos casos fue difícil por la formación de agregados celulares grandes y la oxidación y muerte de los cultivos.

La figura 7 muestra el aumento del volumen celular de siete suspensiones de Dominico: D8m, D8(125), D8-N6, D8-N6(125), D5(180), D13(180) D11(125) y D11(180). Todas las suspensiones fueron cultivadas en medio Ma-2, excepto la suspensión D8- N6 (125  $\mu\text{m}$ ) que fue cultivada en medio N6.

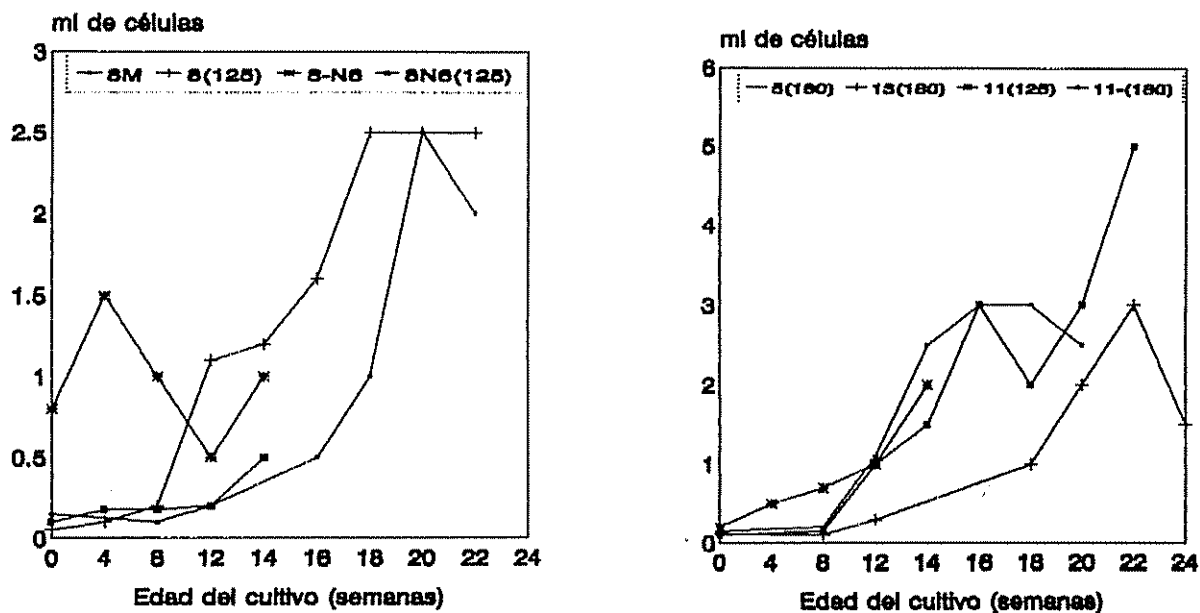


Figura 7. Aumento del volumen celular en suspensiones del Cv. Dominico.

El volumen celular se midió también en las suspensiones finas GE6, GE7, GE8, GE9, y GE11 de Gran Enano, iniciadas con el residuo de células y agregados sobre un filtro de  $125 \mu\text{m}$ ; de éstas sólo fue posible establecer la suspensión GE11 (125), la que mantuvo un crecimiento continuo durante 18 semanas. También, se midió en las suspensiones GE1, GE3 y GE11.

Las suspensiones finas se cultivaron siempre en el medio correspondiente. En las suspensiones GE6, 7, 8, 9, ( $125 \mu\text{m}$ ) y en la GE3 el volumen celular decreció continuamente y finalmente se oxidaron y murieron. Entre la semana 12 y 14 disminuyó el volumen de la suspensión GE11.

La figura 8 muestra el aumento del volumen celular en suspensiones de Gran Enano (ml de células/15 ml de medio).

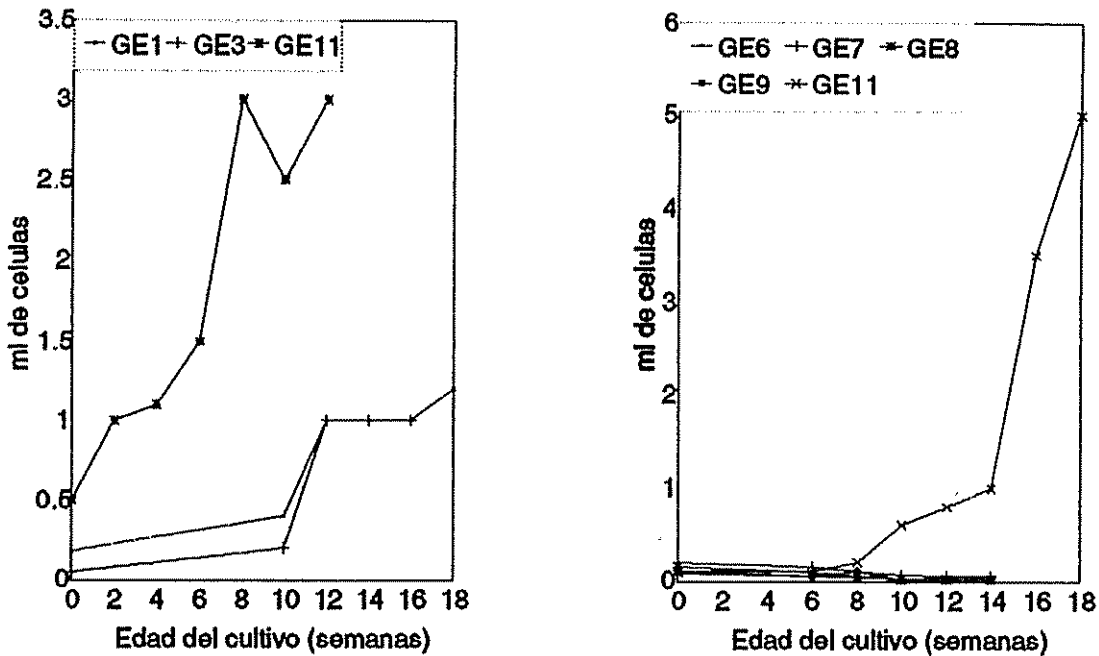


Figura 8. Aumento del volumen celular en suspensiones del Cv. Gran Enano.

#### 4.2.5. Diferenciación de embriones somáticos en medio Ma-3 líquido y semi-sólido.

Cuando se cultivaron alícuotas de 1.0 ml de suspensión celular fina (filtrados 180 ó 125  $\mu\text{m}$ ) en medio de MA-3 se observó la diferenciación de embriones somáticos en el término de 30 a 60 días en medio líquido agitado, y en 30 días en medio semi-sólido en platos petri (Figura 9). Esto se debe, posiblemente, a que las células embriogénicas y los agregados celulares que contenían las suspensiones evolucionaron hasta la formación de embriones en medio Ma-3, el cual es una modificación del medio de Schenk e Hildebrandt (1972), enriquecido con glutamina, extracto de malta, prolina, y tres citocininas: zeatina, 2- ip y cinetina.

Es conocido que las auxinas son importantes en la etapa de inducción embriogénica, durante la cual las células somáticas expresan su totipotencia y forman agregados embriogénicos; mientras que en la etapa de desarrollo de la embriogénesis, que comprende la diferenciación de los agregados embriogénicos hasta formar plantas, se requiere de la presencia de citocininas en el medio de cultivo (Komamine *et al.*, 1992).

La secuencia de cultivo de las suspensiones en medio Ma-2 y luego en Ma-3 se adapta bien a los requerimientos para la diferenciación de embriones somáticos. Además, es importante el aporte de aminoácidos del medio Ma-3, para la división celular.

Los resultados de Novak *et al.* (1989), sustentan la idea de que la zeatina en concentración de  $5\mu\text{M}$  (1 mg/l) es un factor esencial en la diferenciación de embriones bipolares. La cantidad de embriones somáticos diferenciados a partir de 1 ml de suspensión celular fue variable, lo que puede ser consecuencia de la capacidad embriogénica de la suspensión en estudio. En el presente experimento se recuperaron entre 30 y 826 embriones somáticos en 1 ml de suspensión celular. Si bien, esta cantidad de embriones somáticos se considera un buen resultado, la misma es pequeña en comparación con la producción de 200 a 300 embriones somáticos en un volumen de 0,01 ml de suspensión celular (Novak *et al.*, 1989). Marroquín (1991) obtuvo 200 a 300 embriones somáticos en un volumen de 30 ml de suspensión celular de *Musa acuminata* ssp *malaccensis*, esto es entre 6 a 10 embriones por 1 ml de suspensión.

El peso de los embriones somáticos varió entre 0,45 y 0,79 mg, en dependencia del estado de desarrollo. El peso promedio de un embrión somático se estimó en  $0,666 \pm 0,14$  mg (Cuadro 13).

El tamaño de los embriones somáticos formados en las suspensiones celulares varió de 0,5 a 1,2 mm; con promedio de  $0,86 \pm 0,24$  mm.

Cuadro 13. Peso promedio (mg) de los embriones somáticos.

Cultivo	Número ES	Peso(mg)	PESO 1 ES(mg)
GE11	682	313	0,45
GE11	826	423	0,51
D11/125	243	180	0,74
D11/125	453	336	0,74
D11/125	466	360	0,77
GM9	772	615	0,79

Durante el cultivo de las suspensiones en medio de Ma-3 líquido o semi-sólido, algunos embriones formaron sólo raíces y otros pocos germinaron; sin embargo, fue una respuesta esporádica en los cultivares estudiados. En contraste, Novak et al (1989) observaron una fuerte tendencia de los embriones somáticos a formar raíces y una baja habilidad para formar brotes.

Cultivando 1 ml de la suspensión celular Dominico 12 (180  $\mu$ ) en 14 ml de medio Ma-3 líquido, los agregados celulares embriogénicos que ésta contenía se diferenciaron en embriones somáticos maduros en el transcurso de 60 días. El peso de los 481 embriones somáticos recuperados fue 604 mg. Este ensayo se repitió con otras suspensiones celulares, tomando 1 ml de la suspensión fina para cultivarla en 4 ml de medio Ma-3 líquido.

La mayor cantidad de embriones somáticos (633) se obtuvo de 1 ml de la suspensión Dominico 12 (180  $\mu$ ).

Los embriones diferenciados en estas condiciones se pasaron a medio G. La germinación se inició 15 días después y las plantulas desarrolladas se transfirieron a tubos de ensayo con 10 ml de medio MS sin reguladores para su desarrollo.

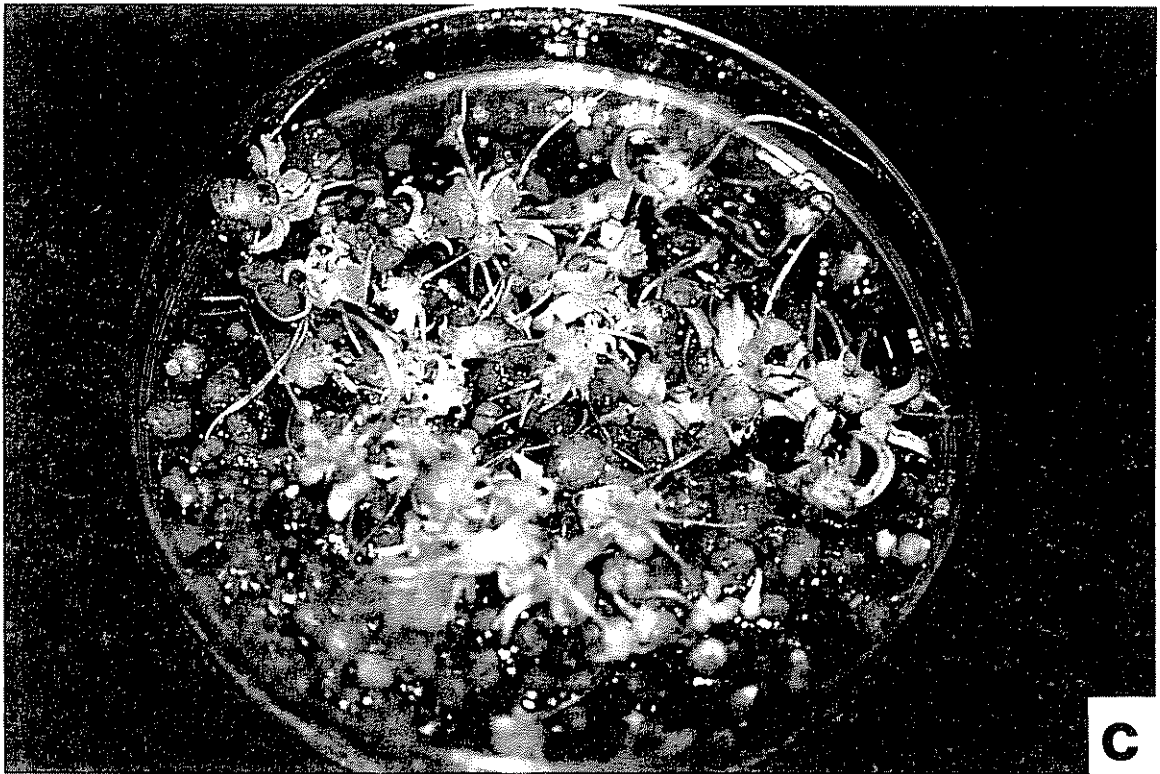
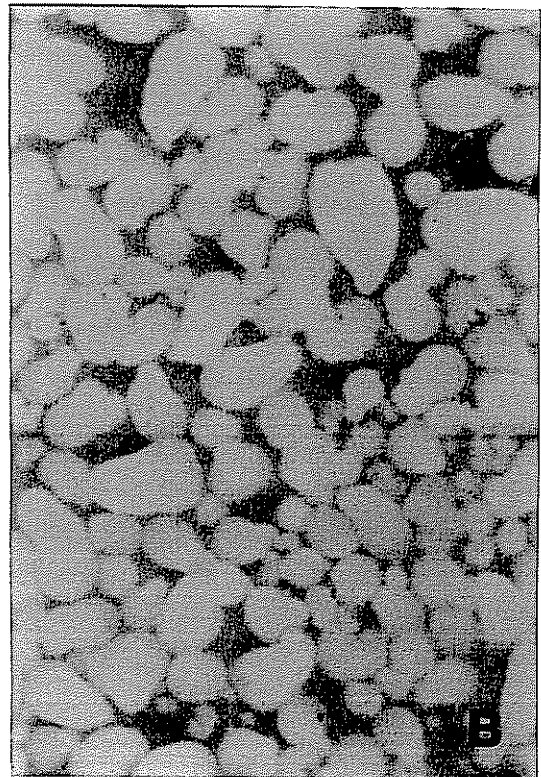
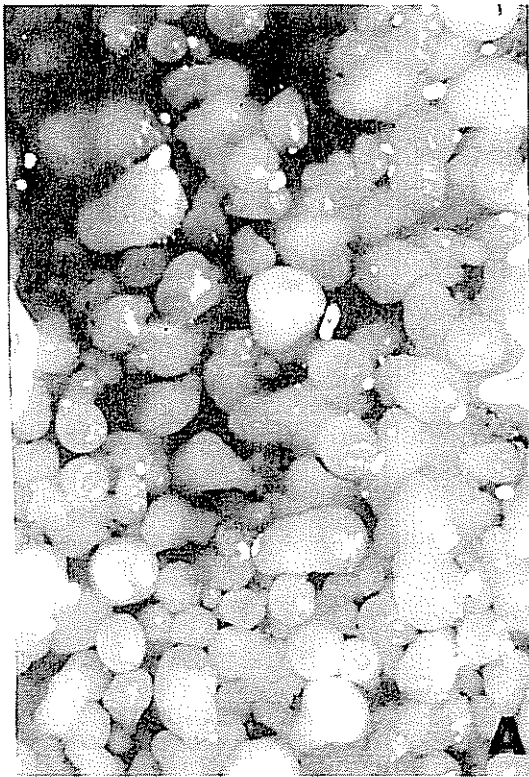


Figura 9. Diferenciación de embriones somáticos a partir de 1 ml de suspensión celular Cv.Dominico 11 ( $125 \mu$ ). A. Medio Ma-3 semi-sólido (18x). B. Medio Ma-3 líquido (24x). C. Germinación en platos Petri.



El cultivo de 1 ml de la suspensión celular Dominico 11 (180  $\mu$ ) en 4 ml de Ma-3 líquido, durante 30 días, permitió la formación de alrededor de 466 embriones somáticos, que pesaron 360 mg. En el cultivo de 1 ml de la suspensión Gran Enano 11 (125  $\mu$ ) en 4 ml de medio Ma-3 líquido se observaron embriones somáticos pequeños a las cuatro semanas de cultivo, en seis semanas los embriones tenían una forma esférica.

En el cuadro 14 se presentan los datos de la diferenciación de embriones en el medio Ma-3 líquido y sólido.

Cuadro 14. Número de embriones formados a partir de 1 ml de suspensión celular en medio de MA-3 semi-sólido y líquido.

SEMI-SOLIDO						LIQUIDO			
GE11	D12	D8-N6	D8-MA2	D11/125	D13	D11/125	D12	GE11	GM9
120	633	49	420	243	161	149	481	359	772
107	259	30	479	163	245	453		398	
140	511	31	108	189	55	466			

Hubo diferencias significativas en la diferenciación de embriones en medio semi-sólido y líquido ( $p= 0.0166$ ), lo que sugiere que la condición física del medio de cultivo es importante para la diferenciación de embriones somáticos.

El promedio de embriones formados en el medio líquido fue de 439 y en el medio semi- sólido fue de 197 embriones.

Hubo diferencias entre las suspensiones ( $p = 0.05$ ). Comparando la suspensión D8 cultivada en medio N6 y Ma-2 semi-sólido, se notó mayor capacidad embriogénica en el medio de Ma-2, tal vez por influencia del medio de cultivo.

#### **4.2.6. Germinación de embriones somáticos**

##### **4.2.6.1. Germinación en medio sólido.**

La germinación de los embriones somáticos, a través del platingo de 1 ml de suspensión celular, se inició en el quinto mes de establecidas las suspensiones.

Cuando las suspensiones se plaquearon directamente en el medio de germinación se observó un crecimiento desuniforme, caracterizado por el desarrollo de hojas o raíces en algunos embriones somáticos, mientras que otros permanecieron sin cambios aparentes. Esto pudo deberse a que los embriones no presentaban el mismo grado de desarrollo al momento del platingo, dando como resultado que aquellos que se encontraban mejor formados reaccionaron en los 15 días seguidos a la inoculación, mientras que los embriones más inmaduros no se desarrollaron; por lo que pudiera ser necesario un período de maduración de los embriones somáticos en un medio apropiado; o bien, algún método de sincronización del desarrollo.

Con el objetivo de solucionar el problema se plaquearon las suspensiones en medio de Ma-3 semi-sólido, en el cual se había notado previamente la formación y crecimiento uniforme de embriones somáticos. Treinta días después de haberse realizado el platingo de las suspensiones se observaron numerosos embriones somáticos pequeños de color blanco. Después de un mes en cultivo en el medio de Ma-3 los embriones somáticos se pasaron al medio de germinación, donde brotaron las hojas y raíces. A pesar de esto, el tiempo transcurrido entre el platingo de las alícuotas de suspensiones y el inicio de la germinación fue de 4 a 6 meses, y la germinación fue baja, entre 16 y 64 % (Cuadro 15). En este caso se presentaron problemas de oxidación, tanto en el medio de Germinación como en MA-3, posiblemente debido a que los embriones fueron cambiados a un medio de diferente composición química.

Cuadro 15. Porcentaje de germinación de embriones somáticos en medio semi-sólido.

Suspensión	ES sembrados	ES germinados	% germinación
D12/180	511	120	23,48
D13/180	269	45	16,72
D13/180	161	104	64,59
D8/125	425	224	52,70
D8/125	349	147	42,12
D11/180	179	30	16,75

La germinación de los embriones cigóticos se inicia con la utilización de las reservas acumuladas durante el proceso de maduración. El desarrollo ontogénico de la embriogénesis cigótica y somática presenta diferencias en el tiempo de obtención de los embriones. En café, la formación de un embrión cigótico maduro transcurren 32 semanas, 10 a 12 de las cuales corresponden al período de latencia durante el cual se acumulan sustancias de reserva que garantizan el estado de madurez fisiológica; en tanto que los embriones somáticos se forman en 18 semanas (Carasco *et al.*, 1994), lo que indica que la ontogenia de estos dos procesos es distinta. Es posible que la ausencia del período de maduración y por consiguiente de sustancias de reserva en los embriones somáticos impida su desarrollo y la germinación. Nótese que la diferenciación de los embriones somáticos a partir de las suspensiones celulares en los cultivares triploides estudiados ocurrió en 30 días; mientras que un embrión cigótico de *Musa accuminata* ssp. *malaccensis* bien formado y con alto contenido de sustancias de reserva se obtiene en 120 días (Marroquín, 1991).

#### 4.2.6.2. Germinación en medio líquido.

Una alternativa para lograr la germinación de los embriones somáticos fue la utilización del cultivo de alícuotas de las suspensiones finas en medio de Ma-3 semi- sólido o líquido, hasta la formación de embriones somáticos pequeños, alrededor de los 30 días y luego transferir los embriones a medio G en el sistema de inmersión temporal. Este método fue probado con los embriones somáticos derivados de las suspensiones del cultivar Dominico. La germinación se inició hacia los 15 días de cultivo y las primeras plantas fueron visibles a los 30 días; sin embargo, no fue masiva y sólo un bajo porcentaje de los embriones germinó. Algo similar fue reportado por Novak *et al.* (1989), quienes lograron el desarrollo completo de embriones somáticos hasta plantas de cuatro cultivares de *Musa* sp., sólo en medio líquido y la germinación no excedió el 1.5 % ; cultivando los embriones en el sistema de doble capa de medio consiguieron un máximo de 12 %.

Es importante resaltar que el cultivo transcurrió sin que hubiera oxidación de los embriones somáticos. El porcentaje de germinación se estimó dividiendo el número de embriones somáticos sembrados entre el número de plántulas formadas.

Cuadro 16. Germinación de embriones somáticos Cv. Dominico en medio líquido.

Suspensión	Peso (g)	ES	ES germinados	% germinación
D11/125-1	0,360	466	71	15,23
D11/125-2	0,336	453	40	8,8
D13	1,098	223	23	10,3

### **4.3. Método de Inmersión Temporal.**

#### **4.3.1. Cultivar Dominico.**

##### **4.3.1.1. Etapa de multiplicación.**

Se iniciaron tres cultivos de inmersión temporal con callos friables que tenían embriones somáticos, sólo el cultivo D2 fue iniciado con un cultivo embrilogénico. El medio de Ma1 PI2 usado para la etapa de multiplicación causó oxidación de los callos hacia los tres meses de cultivo; sin embargo, este medio fue bueno para el crecimiento, teniendo en cuenta que el volumen de los cultivos aumentó continuamente y que se formaron embriones somáticos. El peso inicial de los cultivos fue de 514 mg, 370 mg y 220 mg para D1, D2 y D3, respectivamente. El aumento promedio del peso fue de 78 veces; 97 para D1, 54 para D2 y 83 para D3, respectivamente. (Figura 10).

Durante la etapa de multiplicación se observó vitrificación del cultivo D1 y también embriogénesis secundaria en los tres cultivos.

##### **4.3.1.2. Etapa de Germinación.**

Cuando los cultivos fueron transferidos al medio de germinación la incipiente oxidación evidenciada en la etapa anterior aumentó considerablemente, afectando la germinación de los embriones somáticos y causando la muerte del cultivo. Tratando de solucionar este problema se inició el cultivo en medio de Ma-3, pero en este se encontró una oxidación total al cabo de un mes. Se probó el cultivo por 15 días en Ma-3 seguido del cultivo en MS sin reguladores para la germinación, pero también en este caso la respuesta del cultivo al cambio de medio fue la oxidación de los tejidos, aunque se logró obtener pocas plantas (2 ó 3) en los primeros 15 días del cultivo en MS. En el medio de germinación se observaron los primeros embriones germinando a los 30 días, primero emergió la raíz y luego las hojas.

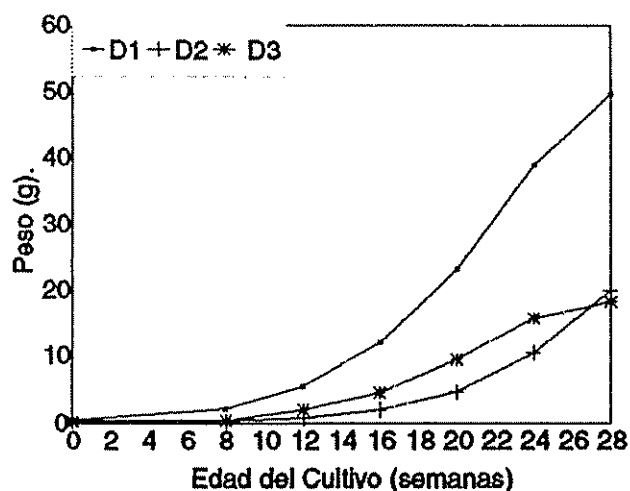


Figura 10. Aumento del peso de los cultivos en el sistema de inmersión temporal. Cv. Dominico.

El porcentaje de germinación se estimó considerando el peso de un 1 embrión es igual a 1 mg, y dividiendo el número de plántulas entre el peso inicial de los embriones sembrados multiplicado por 100.

Cuadro 17. Porcentaje de germinación de embriones somáticos de Cv. Dominico en el sistema de inmersión temporal.

Cultivo	Medio de cultivo	Peso inicial (g)	Número de plantas	% germinación
D1	Germinación	0,514	25	4,86
D1	Ma-3 MS	0,844	8	0,94
D1	Ma-3 MS	1,783	5	0,28
D2	Ma-3 MS	0,641	3	0,46
D3	Ma-3 MS	1,546	7	0,45

### 4.3.2. Cultivar Gros Michel.

#### 4.3.2.1. Etapa de multiplicación.

El material inicial usado para establecer los cultivos GM2 y GM4 fueron callos friables con embriones somáticos, en tanto que los cultivos GM1 y GM3 se iniciaron con cultivos embriogénicos. El peso inicial de los cultivos fue de 10 mg, 21 mg, 10 mg y 9 mg para GM1, GM2, GM3 y GM4, respectivamente. A pesar de la diferencia de los explantes iniciales los cultivos en inmersión temporal mostraron la misma tendencia de aumento de peso.

El aumento promedio de los cultivos fue de 486 veces; 618, 368, 464 y 494 veces para GM1, GM2, GM3 y GM4 respectivamente. (Figura 11). En este cultivar no se presentaron problemas de oxidación.

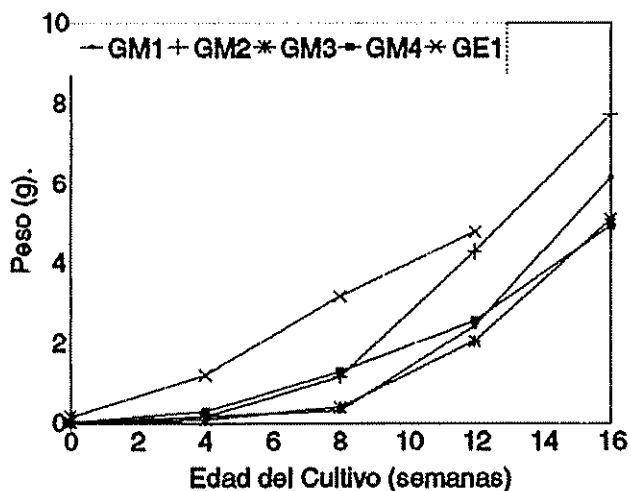


Figura 11. Aumento del peso de los cultivos en el sistema de inmersión temporal. Cv. Gros Michel.

La observación al microscopio de la suspensión circulante en la unidad de inmersión temporal permitió identificar células esféricas pequeñas, con contenido citoplasmático denso, creciendo solas o formando agregados

celulares, así como también células en división y proembriones, similar a lo que ocurre en una suspensión celular (Figura 12). En cuanto al contenido citoplasmático, las células reaccionaron a la tinción para almidón y proteínas.

### 3.2.2. Etapa de Germinación.

El cultivo de Gros Michel en medio de germinación dió resultados satisfactorios. La germinación se inició 3 meses después de iniciado el cultivo GM1. A los 4 meses de cultivo en medio de germinación fue posible recuperar 528 plantas a partir de 560 mg de callo embriogénico. A los seis el total de plántulas recuperadas fue de 803. La germinación de los cultivos GM2 y GM4 fue evaluada durante 30 días, produciendo 45 y 62 plantas, respectivamente. (Cuadro 18).

Cuadro 18. Porcentaje de germinación de embriones somáticos de Cv. Gros Michel en el sistema de inmersión temporal.

Cultivo	Medio	Peso Inicial (g)	Número de plantas	% germinación
GM 1	Germinación	0,560	803	143,3
GM 2	Germinación	0,423	45	10,6
GM 4	Germinación	0,414	62	14,9

Si bien, para la etapa de germinación se asumió que el peso de un (1) embrión somático era de 1 mg, en el caso del cultivo GM 1 se obtuvieron más plantas de lo que se esperaba. Esto puede deberse a que el peso de los embriones somáticos esté sobre estimado, siendo el peso real menor a 1 mg; o bien, que en el cultivo embriogénico se estén formando constantemente



agregados celulares y proembriones los cuales se desarrollan hasta convertirse en embriones somáticos maduros. Durante la germinación no se presentaron problemas de oxidación.

Un estudio similar, conducido por Escalant et al. (1994a), con el cultivar Gran Enano dió resultados comparables en las tasas de multiplicación y germinación de embriones somáticos.

Los resultados obtenidos con los cultivares Dominico y Gros Michel confirman el valor potencial del método de inmersión temporal para la propagación masiva y la producción de embriones somáticos destinada a programas de mejoramiento genético.

Es importante determinar la estabilidad genética de las plantas producidas bajo este método, debido a que envuelve un proceso de inducción de callo y que durante la etapa de multiplicación se observó la formación de embriones adventicios sobre embriones primarios, lo que fue más evidente en el cultivar Dominico.

Debido a que la etapa de germinación se inicia con embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo, éste proceso transcurre de forma asincrónica, demorando más de cuatro meses para lograr el 100 % de germinación. La germinación temprana de los embriones más desarrollados puede crear algún tipo de competencia por nutrientes dentro de una unidad de inmersión temporal. Por esta razón, sería conveniente realizar algunas pruebas para determinar el peso máximo de embriones somáticos para germinación en una unidad de inmersión temporal, que permita acortar el tiempo y, a la vez, lograr el máximo de germinación. También, podría ser de utilidad, el uso de algún método mecánico de sincronización del crecimiento de los embriones somáticos, como la separación por tamaños, antes de iniciar la germinación.

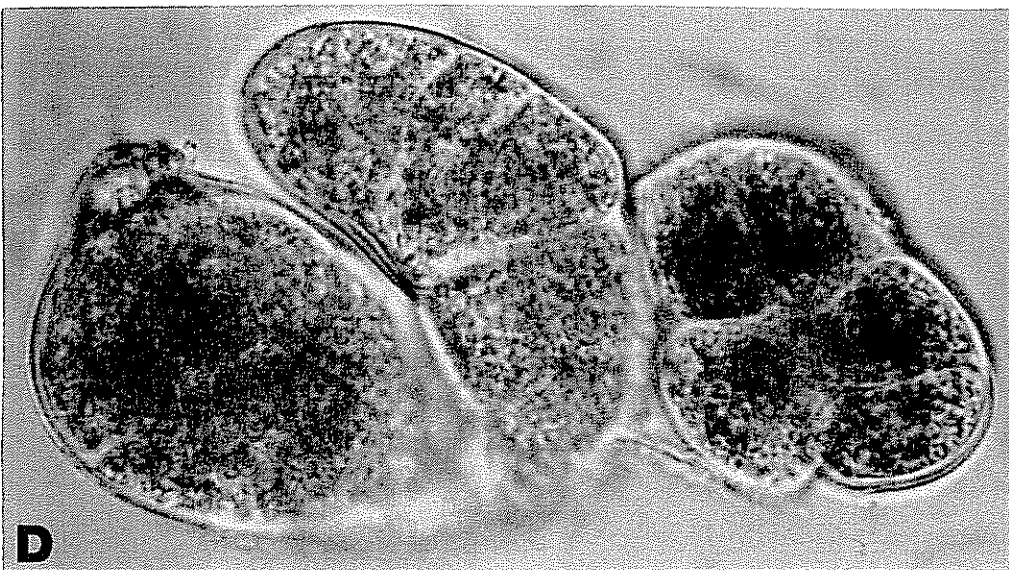
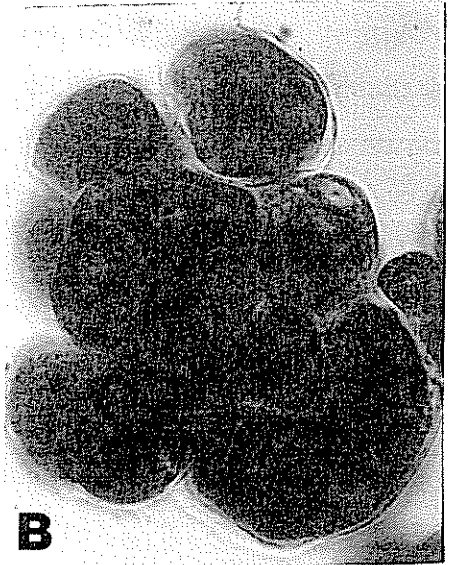
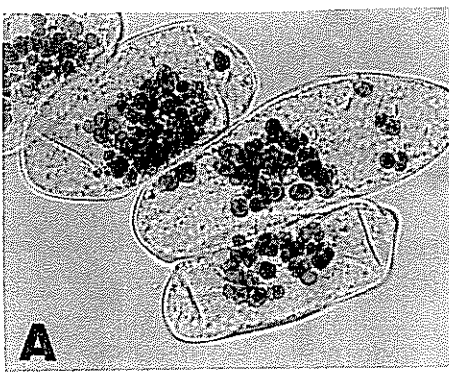


Figura 12. Contenido citoplasmático en células en suspensión y en el sistema de inmersión temporal. A. Granos de almidón en células de Dominico (20x). B. Proteínas en células en división de Dominico (20x). C. Proteínas en embriones somáticos de Dominico (10x). D. Almidón en células y proembriones de Gros Michel en inmersión temporal (40x). E. Proteínas en células en división de Gros Michel en inmersión temporal.

#### **4.3.3. Desarrollo de las plantas.**

Las plantas regeneradas por el método de inmersión temporal en los filtros Nalgene se transfirieron regularmente a medio de MS sin reguladores del crecimiento, donde se completó el desarrollo, alcanzando 8 cm de alto en dos meses y luego fueron sembradas en macetas, para la aclimatización en invernadero (Figura 13).

Hasta el momento de culminar este trabajo, se tenían en Invernadero plantas de Gros Michel (GM1) y Dominico (D1), obtenidas por el método de inmersión temporal y otras, regeneradas de la suspensión celular de Dominico (D12). En medio de desarrollo se tienen plantas de GM2 y GM4 del método de inmersión temporal y Dominico 13 de suspensión celular.

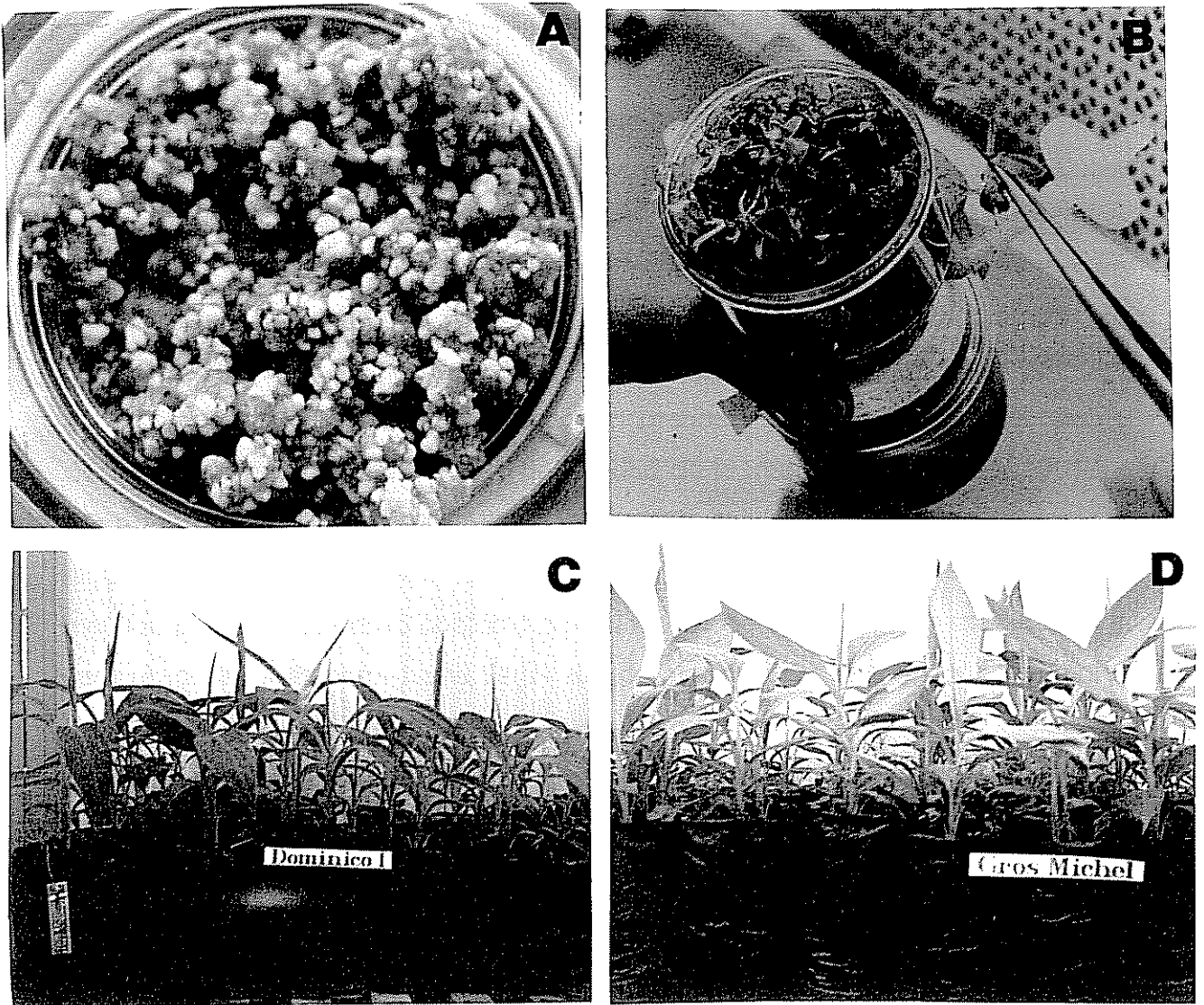


Figura 13. Desarrollo de los cultivos con el método de inmersión temporal.

A. Multiplicación de cultivos embriogénicos. B. Regeneración de plantas.

C y D. Aclimatación de plantas en invernadero.

#### **4.4. Estudios Histológicos.**

##### **4.4.1. Caracterización de las manitos de flores masculinas.**

En cortes longitudinales de las manitos de flores sin cultivar se pudo observar que la región distal está formada por tejido parenquimático de células compactas, indiferenciadas, de forma rectangular, con núcleo prominente, típico de células meristemáticas. La región basal, por su parte está formada por un tejido parenquimático que presenta un arreglo poco compacto, donde las células se separan más fácilmente entre sí, debido a la presencia de grandes espacios intercelulares. Los núcleos son menos prominentes. Es importante destacar que independientemente de la edad de la manito (rangos 6, 8, 10, 12 y 14) no hubo diferencias entre ellas en el arreglo celular y en ninguna se apreció algún tipo de diferenciación celular. (Figura 14A). Por el contrario, aquellas manitas que estuvieron en contacto con el medio de cultivo fueron madurando y cambiando su estructura hasta llegar a la formación de callos y posteriormente, de embriones somáticos.

Los cortes histológicos de manitas cultivadas durante 30 días, se caracterizan por una intensa división celular en diferentes planos así como núcleos y nucleolos prominentes.

En este estado fue posible observar elementos del tejido vascular en formación. Las bandas de procambium bien diferenciado no siguen una determinada dirección, sino que se dirigen en diferentes sentidos, dando un aspecto desordenado al tejido vascular (Figura 14B).

Las estructuras nuevas se encuentran cerca de los elementos vasculares, en la región media del dedito, lo que sugiere que su origen es procambial o vascular (Figura 14C). No obstante, en algunos casos la parte distal de los deditos mostró también la formación de nuevas células.

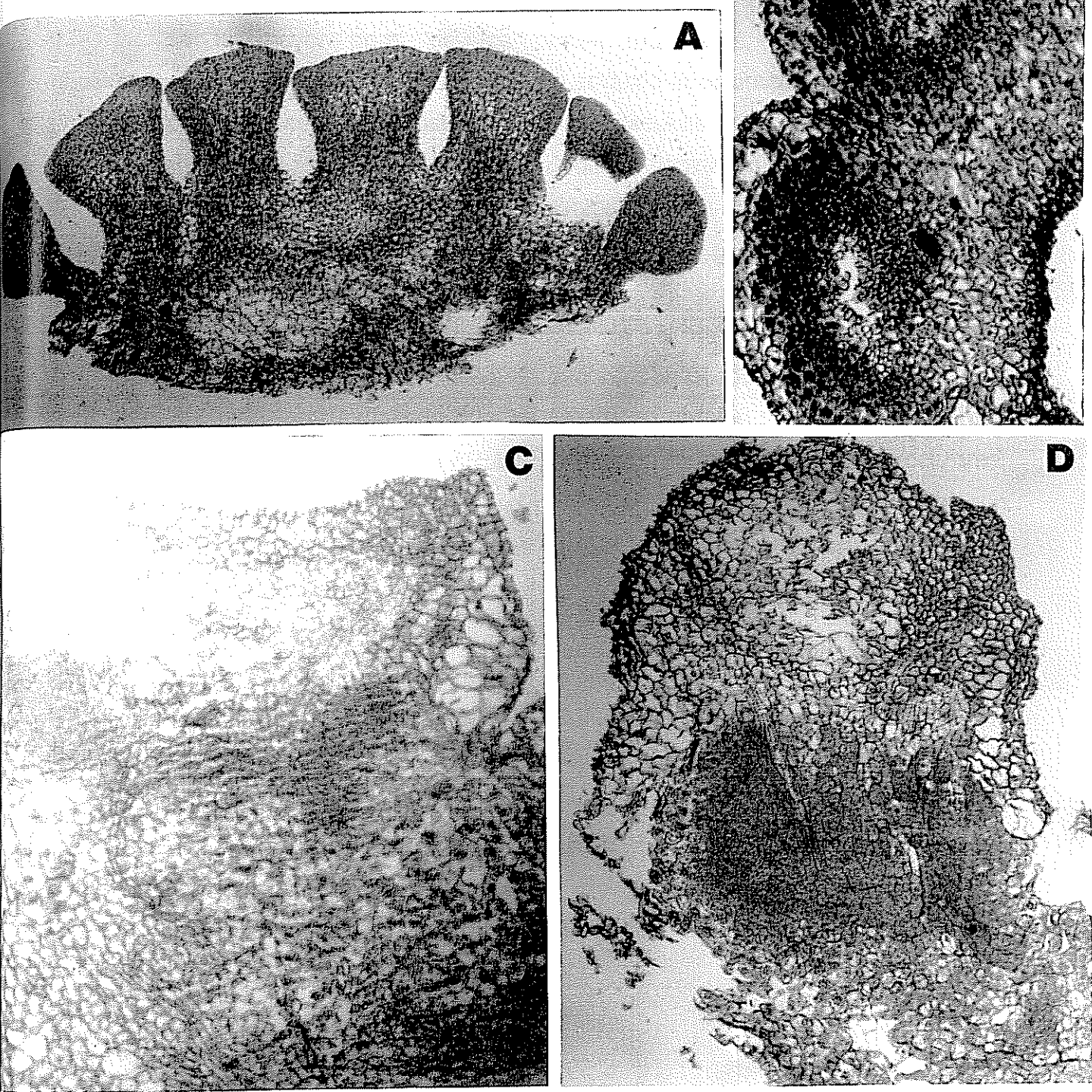


Figura 14. Cortes histológicos de las manitos de flores.

- A. Manito 6 sin cultivar (4x).
- B. Manito 6 cultivada 30 días (4x).
- C. Detalle de un dedito cultivado por 30 días (4x).
- D. Formación de callo en el interior de un dedito cultivado por 30 días (4x).

En la mayor parte de los cortes estudiados, utilizando diferentes exposiciones a la safranina, el xilema no adquirió la coloración roja esperada, lo que puede deberse a que éstos elementos vasculares eran aún inmaduros y no había culminado el proceso de deposición de lignina en la pared celular. Se observó además gran acumulación de almidón.

Las manitos cultivadas fueron bastante más grandes en tamaño que aquellas sin cultivar.

En comparación con la gran cantidad de células en división que se pudo observar en las manitos cultivadas, se encontraron pocos elementos vasculares, lo que puede estar indicando que las células en división no originan elementos vasculares. Muchas de esas células en división formaron agregados celulares, los cuales adquirieron una tonalidad parda con la tinción, en comparación con la tonalidad verde que presentan las células vecinas. Se observó crecimiento individual de cada dedito, el que muchas veces se abrió para dar paso a nuevas células de callo en formación.

#### **4.4.2. Desarrollo de los callos y cultivos embrionarios.**

Los cortes histológicos de las manitos mostraron que existen diferentes respuestas al medio de cultivo. Algunos explantes iniciales entran en un proceso de envejecimiento y presentan una gran cantidad de células con una coloración negra y ruptura de las paredes celulares. Estas son más frecuentes en la base de la manito. (Figura 15A).

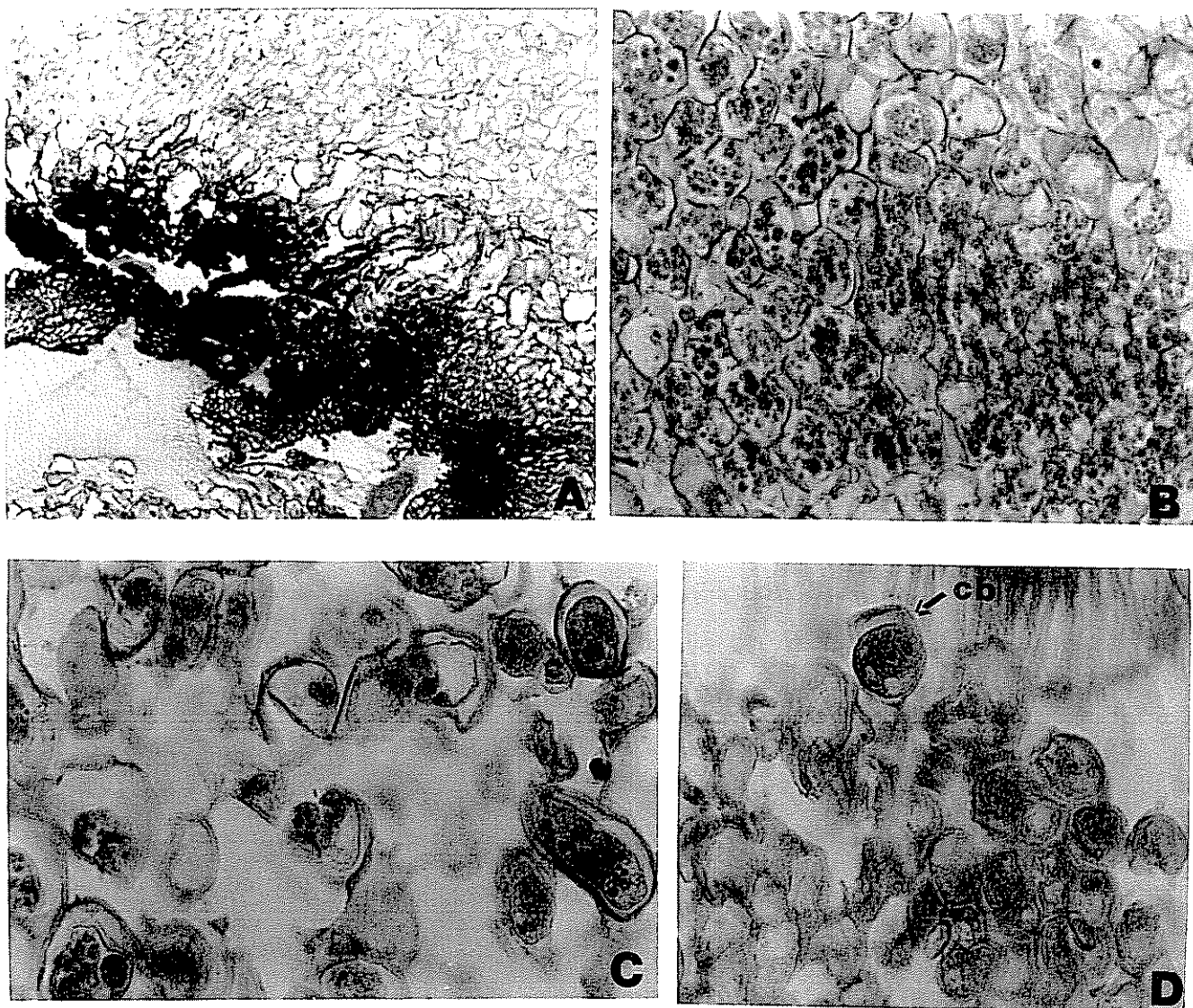


Figura 15. Cortes histológicos en manitos del Cultivar Gran Enano.

- A. Necrosis de las células en la parte basal de la manito (4x).
- B. Acumulación de almidón. Nótese la diferencia en la coloración de los granos (10x).
- C. Células que se desprenden del callo (20x).
- D. Célula binucleada embriogénica (cb) (20x).



Las células que permanecen vivas acumulan almidón pero no presentan signos de división celular. Las manitos que reaccionan positivamente al medio de cultivo se caracterizan por estar en muy buen estado, además de presentar divisiones celulares frecuentes en la región de los dedos, formando callos. Así, a los dos meses de cultivo los dedos se caracterizan por la acumulación de almidón. Las células cercanas a la periferia empiezan a mostrar un cambio en la coloración del almidón pasando de violeta a pardo (Figura 15B), que parece indicar utilización de reservas. Esto se observa también en el callo que se formó. Algunas de éstas células se desprenden con facilidad del callo y originan células embriogénicas (Figura 15C). Las últimas se diferencian de sus vecinas por un aumento en su tamaño, un citoplasma denso teñido de color verde, la presencia de poco almidón, núcleo o nucleolo grandes, y en ocasiones por la presencia de células binucleadas (Figura 15D). Algunas de éstas se encuentran formando grupos de hasta 4 y 5 células, originando pequeños proembriones, o bien, estados más diferenciados donde se pueden observar embriones en etapas tempranas de su desarrollo (Figura 16).

Los callos de tres meses de edad mantienen la producción de gran cantidad de células embriogénicas, además de la producción de embriones bien desarrollados formados a partir de células que se desprenden del callo inicial (Figura 16).

Todo este proceso continúa en los callos de 4, 5 y 6 meses, donde la cantidad de embriones y células embriogénicas es aún mayor. Los callos de más edad presentan además zonas compuestas por células meristemáticas. Estas son células pequeñas, de núcleo grande que están en activa división celular y que se localizan generalmente hacia el centro del callo. Se observa también el desarrollo de mucho tejido vascular en el centro del callo.

Con frecuencia se aprecia la formación de células que se desprenden del callo, crecen 3 o 4 veces su tamaño normal, acumulan almidón y lípidos pero no muestran signos de división celular. Se diferencian de las embriogénicas por su tamaño más grande y el contenido citoplasmático menos denso.

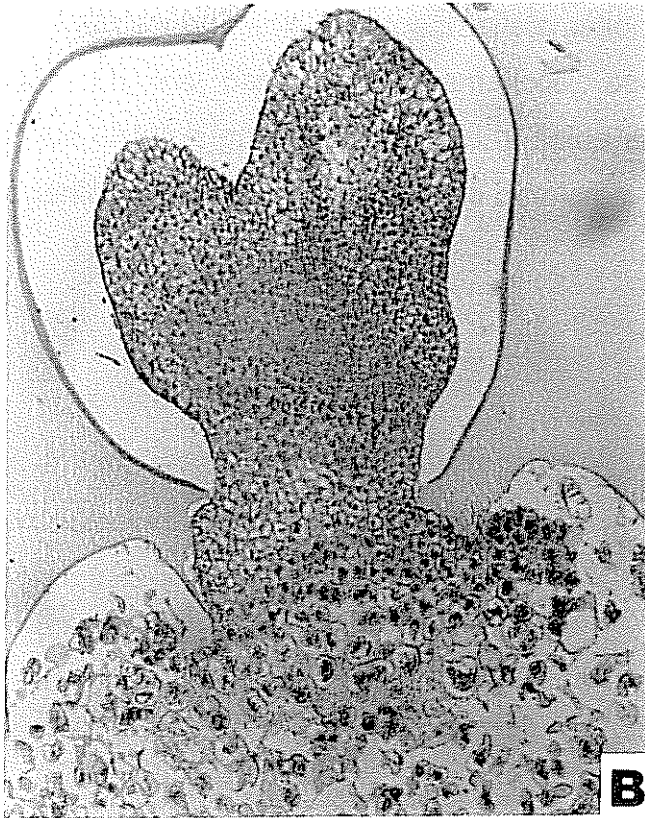


Figura 16. Embriones somáticos diferenciados en callos friables embriogénicos de Gran Enano de dos (A) y tres meses (B). (4x).

En cortes de manitos cultivadas durante seis meses se apreció un tejido de callo compacto seguido por una zona de células sueltas, que se desprenden del callo, a continuación de éstas últimas se formó el cultivo embriogénico propiamente (Figura 17A), caracterizado por gran cantidad de embriones en diferentes estados de desarrollo. Nótese la demarcación de paredes celulares, delimitando los embriones somáticos (Figura 17B). En algunos casos los embriones somáticos están unidos a los callos que los originaron (Figura 17C).

Los eventos evidenciados en este estudio histológico muestran cierta similitud con el desarrollo de callos embriogénicos en otras especies. Así, Touchet *et al.* (1991), observaron grupos de células embriogénicas rodeadas por una pared celular gruesa, separadas del callo. Tisserat y De Mason (1980) y Schwendiman (1988) encontraron centros meristemáticos en el interior de callos compactos. En los centros meristemáticos, se formaron paredes celulares gruesas que aislaron grupos de células, y éstos al dividirse originaron agregados embriogénicos y embriones somáticos bipolares.

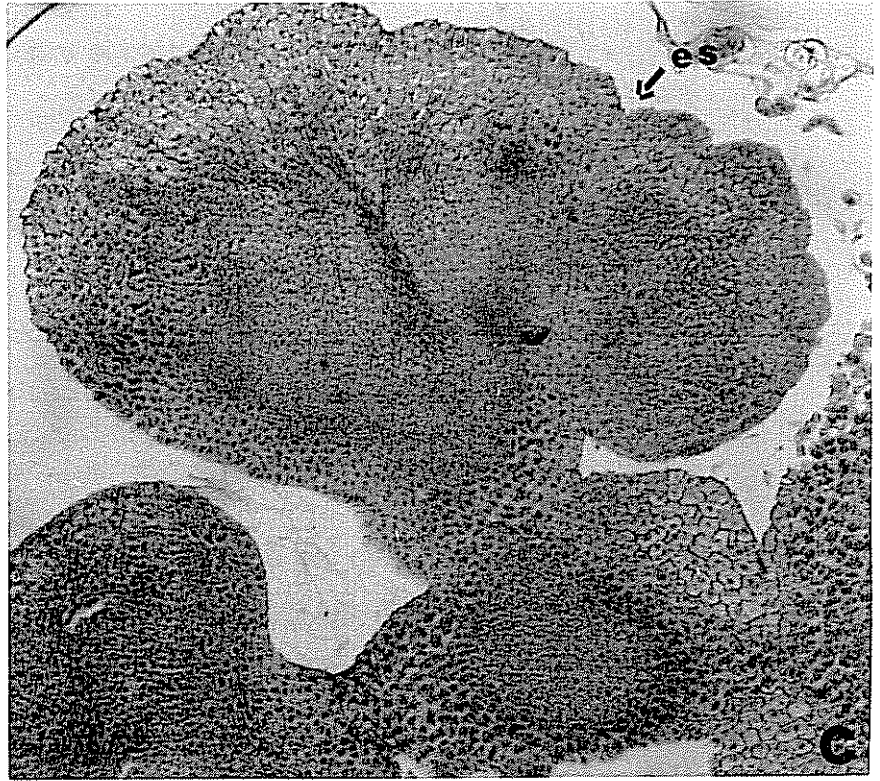
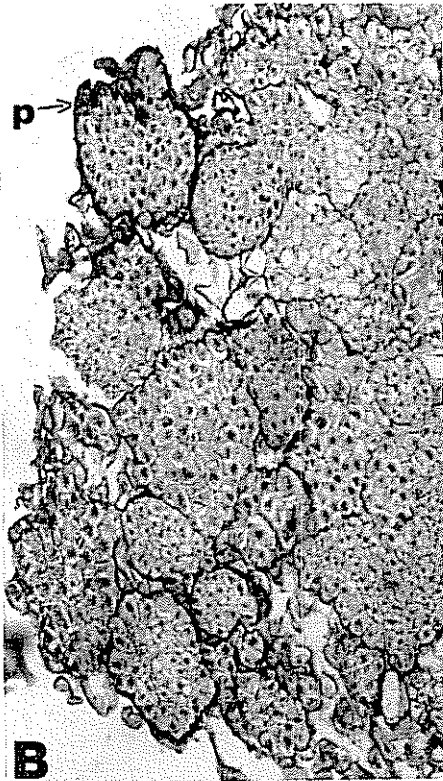


Figura 17. Cortes histológicos de cultivos de seis meses. Cv. Gran Enano.

A. Callo compacto (cc), células sueltas embriogénicas (cs) cultivo embriogénico (ce) (10x). B. Cultivo embriogénico. Nótese la demarcación de paredes celulares (p) (4x).

C. Embrión somático (es) (4x).

## 5. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron cultivos embriogénicos de los cultivares de *Musa* AAA cvs. Gran Enano y Gros Michel, *Musa* AAB Cv. Dominico y *Musa* AAAB cv. EMBRAPA 403, utilizando como explantes las inflorescencias masculinas.
2. La formación de callos friables y cultivos embriogénicos se obtuvo en los tratamientos con 30 g de sacarosa. La adición de prolina y zeatina al medio de cultivo Ma-1 por separado, contribuyen a mejorar la producción de cultivos embriogénicos.
3. Los callos friables y cultivos embriogénicos derivados de las inflorescencias masculinas, fueron un buen material para la iniciación de suspensiones celulares embriogénicas y para el cultivo por el método de Inmersión temporal.
4. Los medios de cultivo más apropiados para el crecimiento de las suspensiones celulares fueron el Ma-2 y Ma1-Pi2.
5. Se logró la diferenciación de embriones somáticos de los cultivares Dominico, Gros Michel y Gran Enano a partir de suspensiones celulares en medio Ma-3 líquido y semi-sólido.
6. La germinación de los embriones somáticos del cv. Dominico obtenidos de las suspensiones celulares se logró en medio con AIA (2 mg/l) y BAP (0.5 mg/l) en el sistema de inmersión temporal.
7. Se logró la regeneración de plantas completas de los cultivares Dominico y Gros Michel en el sistema de inmersión temporal.

8. Con el sistema de inmersión temporal se obtuvieron tasas promedio de multiplicación de los cultivos embriogénicos de 78 y 486 veces el peso inicial, para los cultivares Dominico y Gros Michel, respectivamente.

9. El medio de Ma1-Pi2 fue apropiado para conseguir altas tasas de multiplicación de los cultivos embriogénicos en el sistema de Inmersión temporal.

Por primera vez se logró inducir la embriogénesis somática en los cultivares EMBRAPA 403, DOMINICO y GROS MICHEL, utilizando como explante inflorescencias masculinas próximas al meristemo floral, en un medio de cultivo semi-sólido.

Igualmente, este es el primer informe acerca de:

- el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas, de los cultivares Dominico y Gros Michel;
- la exitosa regeneración de plantas de los cultivares Dominico y Gros Michel por el método de inmersión temporal, y
- la regeneración de plantas del cultivar Dominico a partir de suspensiones celulares.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el gran potencial que ofrecen el método de inmersión temporal y el cultivo de suspensiones celulares.

Utilizando adecuadamente estos métodos es posible regenerar una gran cantidad de plantas con fines de propagación o producir suficiente material para trabajos de mejoramiento genético, tales como la transformación genética, mediante el bombardeo de partículas, o para estudios de selección *in-vitro*.

La utilización de las inflorescencias masculinas, para inducir el desarrollo de embriogénesis somática, abre una nueva posibilidad de mejoramiento genético de los cultivares triploides y tetraploides.

## **6. RECOMENDACIONES**

1. Continuar el estudio sobre la diferenciación de embriones somáticos en medio semi-sólido y líquido, a partir de las suspensiones celulares.
2. Realizar estudios de germinación de los embriones somáticos derivados de las suspensiones celulares en el método de inmersión temporal.
3. Estudiar métodos mecánicos de separación por tamaño de los embriones somáticos para germinación en el sistema de inmersión temporal.
4. Determinar la cantidad óptima de embriones somáticos para germinación en una unidad de inmersión temporal, que permita acortar el tiempo y conseguir un máximo de germinación.
5. Investigar el efecto de ABA en la maduración de los embriones somáticos de Musáceas.
6. Evaluar en condiciones de campo las plantas obtenidas en el presente estudio, por ambos métodos de regeneración, para establecer su estabilidad y/o variabilidad genética .

## 7. LITERATURA CITADA

- ACOSTA DE GUERRA, K; ARIAS, A.; MARCELINO, L.; PONS, S. 1987. La situación de los cultivos de plátano y de banano en Panamá. // Reunión INIBAP para América Latina y el Caribe (1986, San José, Costa Rica). Memorias. Eds. R.Jaramillo; N.Mateo. INIBAP, San José, Costa Rica. p. 96- 118.
- ADKINS, S.W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S.J. 1993. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. *Journal of Experimental Botany* (E.E.U.U) 44 (269): 1829-1835.
- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Holanda) 32: 55-60.
- ALVES, E.J. 1990. Importancia de la actividad bananera en los países productores. *Augura* (Colombia) 16: 31-46.
- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* (E.E.U.U.) 164: 207-214.
- AUGURA. 1989. Mercado Mundial del Plátano. *Augura* (Colombia) 15:85-89.
- BUREAU, E.; MARIN, D.; GUZMAN, J.A. 1992. El sistema de preaviso para el combate de la sigatoka negra en banano y plátano. UPEB, Panamá.
- CARASCO, C.; DUFOUR, M.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. 1994. Ontogenèse comparative de l'embryogenèse zygotique et somatique chez *Coffea* sp. *Café Cacao Thé* 38(1): 11-18.
- CHAMPION, J. 1978. El Plátano. Editorial Blume. Barcelona, España. Cuarta edición. 247p.
- CHEE, R.P; LESKOVAR, D.I.; CANTLIFFE, D.J. 1992. Optimizing embryogenic callus and embryo growth of a synthetic seed system for sweet potato by varying media nutrient concentrations. *Journal of the American Society of Horticultural Science* (E.E.U.U.) 117 (2): 663-667.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* (Peking) 18:659-668.
- CIRAD. LABORATOIRE DE CYTOGENETIQUE ET D'HISTOLOGIE VEGETALE. 1989. Manuel pratique d' histologie végétale. Montpellier, Francia. Mimeo. 61p.



- CLAPAROLS, I.; SANTOS, M.A.; TORNÉ, J.M. 1993. Influence of some exogenous amino acids on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino acids content. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (E.E.U.U.)* 34: 1-11.
- CONOVER, W.J. 1980. Practical nonparametric statistics. Segunda edición. John Wiley and Sons Inc., Estados Unidos. p. 229.
- CRONAUER, S.; KRIKORIAN, A.D. 1983. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (*Musa ABB*). *Plant Cell Reports (E.E.U.U.)* 2: 289- 291.
- ; KRIKORIAN, A.D. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Reports (E.E.U.U.)* 7: 23-25.
- CROUCH, M.L. 1982. Non-zygotic embryos of *Brassica napus L.* contain embryo-specific storage proteins. *Planta (E.E.U.U.)* 156: 520-524.
- DEBEAUJON, I.; BRANCHARD, M. 1993. Somatic embryogenesis in *Cucurbitaceae*. *Plant cell, tissue and organ culture.* 34: 91-100.
- DHED'A, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B.; VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. 1991. Plant regeneration in cell suspensions cultures of the cooking banana cv Bluggoe (*Musa* ssp. ABB group). *Fruits (Francia)* 46(2): 125-135.
- . 1992. Culture de suspensions cellulaires embryogeniques et regeneration en plantules par embryogenese somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* ssp). Thesis Ph.D. Lovaina, Belgica, Katholieke Universiteit Leuven. 167 p.
- EAPEN, S.; GEORGE, L. 1993. Somatic embryogenesis in peanut: influence of growth regulators and sugars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (E.E.U.U.)* 35: 151-156.
- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1988. Embriogenese somatique chez *Musa* sp. *Comptes Rendus de l' Academie des Sciences (Sciences de la vie) (Francia)* 306 (8): 277-281.
- ; TEISSON, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports (E.E.U.U.)* 7: 665-668.
- ; TEISSON, C.; COTE, F. 1994 a. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* sp.). *In vitro Cellular and Developmental Biology (E.E.U.U.)* 30P: 181-186.
- ; ORTIZ, J.L.; PÉREZ, L. 1994 b. Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de flores masculinas de los cultivares triploides de banano y plátano. *In: CATIE. Programa de Agricultura Tropical Sostenible. Area de Cultivos Tropicales. Biotecnología. Informe Anual para 1993. Turrialba, Costa Rica. s/p.*

- FAO. 1993. Anuario de Producción. Vol. 46. 1992. Roma, Italia.
- FEIRER, R.P.; CONKEY, J.H.; VERHAGEN, S.A. 1989. Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos. *Plant Cell Reports (E.E.U.U.)* 8: 207-209.
- FINNER, J.J. 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose containing medium. *Plant Cell Reports (E.E.U.U.)* 6: 372-374.
- HABERLANDT, G. 1902. Experiments on the culture of isolated plant cells. Citado por A.D. Krikorian. 1969. *The Botanical Review (E.E.U.U.)* 35(1): 68-85.
- HACCIUS, B. 1978. Question of unicellular origin of non- zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology (E.E.U.U.)* 28(1): 74-81.
- HWANG, S.C. 1988. Tissue culture derived mutants of giant Cavendish resistant to race 4 of *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense*. In Reunión ACORBAT (8, 1987, Santa Marta, Colombia). Memorias. Eds R.Jaramillo, A. Restrepo, R. Bayona. Augura, Medellín, Colombia. p. 77-90.
- INIBAP. 1993. Biotechnology applications for banana and plantain improvement. In Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica). Proceedings. Montpellier, Francia. p.225-235.
- KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIWARA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. *In vitro Cellular and Developmental Biology. (E.E.U.U.)* 28 p: 11-14.
- LEON, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. IICA. San José, Costa Rica. 445 p.
- LINDSEY, K.; TOPPING, J. 1993. Embryogenesis: a question of pattern. *Journal of Experimental Botany (G.B.)* 44 (259): 359-374.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis y organogénesis. In Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Eds. W.M.Roca, L.Mroginski. CIAT. Cali, Colombia. p. 143-172.
- MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E.G. 1985. Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. *Annals of Botany (E.E.U.U.)* 56: 619-630.
- MARROQUIN, C.G. 1991. Suspensiones celulares y embriogénesis somática en *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 114 p.

- ; PADUSCHECK, C.; ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro Cellular and Developmental Biology* (E.E. U.U.) 29: 43-46.
- MAY, R.A.; TRIGIANO, R.N. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *Journal of the American Society of Horticultural Science* (E.E.U.U.) 116(2): 366-371.
- MOREL, G. 1950. Sur la culture des tissus de deux monocotylédones. *Comptes Rendus de l' Academie des Sciences*. (Francia) 230: 1099-1101.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 15: 473-497.
- NOEL, A.R.A. 1964. A staining and mounting combination for sections of plant tissues. *Stain Technology* (E.E.U.U.) 39: 324-325.
- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; PEREA D., M.; DUREN, M. van; CONGER, B.V.; TANG, X. 1988. Embriogénesis somática y mutaciones inducidas mediante cultivos in vitro del banano y plátano (*Musa* spp). *In Reunión ACORBAT*. (8, 1987, Santa Marta, Colombia). *Memorias*. Eds. R.Jaramillo, A.Restrepo, R.Bayona. Augura, Medellín, Colombia. p.99-103.
- ; AFZA, M; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M; CONGER, B.V.; TANG XIAOLANG. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Biotechnology* (E.E.U.U.) 7: 154-159.
- PARROT, W. 1983. Cell culture techniques. *In Biotechnology applications for banana and plantain improvement*. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica). *Proceedings*. Montpellier, Francia. p.183-191.
- REINERT, J.; YEOMAN, M.M. 1982. *Plant Cell and Tissue Culture. A laboratory manual*. Springer- Verlag, Alemania. p. 12-14.
- ROWE, P. 1987. Banana breeding in Honduras. *In Banana breeding and plantain strategies*. ACIAR Proceedings Series (Australia) 21: 74-77.
- ; ROSALES, F. 1989. La contribución de la FHIA a la seguridad alimentaria y a la sobrevivencia de la industria del banano. *Informe UPEB 88-89* (Panamá). p. 59-61.
- SANNASGALA, K. 1989. *In vitro somatic embryogenesis in Musa*. Thesis Ph.D. Lovaina, Belgica, Katholieke Universiteit Leuven. 172 p.
- SCHENK, R.U.; HILDEBRANDT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* (Canadá) 50: 199-204.

- SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. 1988. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany (E.E.U.U.)* 31: 247-258.
- SHII, C.T.; MA, S.S.; HUANG, I.C.; CHING, W.S. 1992. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in suspension cell cultures of triploid bananas (*Musa AAA*) subgroup Cavendish. // International Symposium on recent development in banana cultivation technology. Program and Abstracts. 14-18 diciembre 1992. Taiwan Banana Research Institute, Pintung, Taiwan. p. 21-22.
- SIMMONDS, N.W. 1987. Classification and breeding of bananas. In: Banana and plantain breeding strategies. ACIAR Proceeding Series (Australia) 21: 69-73.
- SONGSTAD, D.D.; PETERSEN, W.L.; ARMSTRONG, C.L. 1992. Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (*Poaceae*). *American Journal of Botany (E.E.U.U.)*. 79(7): 761-764.
- STOVER, R.H.; BUDDENHAGEN, I.N. 1986. Banana breeding: poliploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41(3)
- ; SIMMONDS, N.W. 1987. Bananas. 3a. edición. Longman Scientific and Technical. Singapore. 467 p.
- TISSERAT, B.; DE MASON, D.A. 1980. A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany (E.E.U.U.)* 46: 465-472.
- TOUCHET, B. de; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports (E.E.U.U.)* 10: 529-532.
- VILLALOBOS, V.; THORPE, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. // Cultivo de tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones. Eds. W.M.Roca, L.A. Mroginski. CIAT, Cali, Colombia. p. 127-141.
- VALK, P. VAN DER; ZALL, M.A.C.M.; CREEMERS-MOLENAAR, J. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus cultures of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass). *Plant Cell Reports (E.E.U.U.)* 7: 644-647.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany (E.E.U.U.)* 57: 443-462.

## 8. ANEXOS

## ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO.

	MEDIO MS	MEDIO N-6	MEDIO SH
	mg/l	mg/l	mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	---	463	---
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650		
$\text{KNO}_3$	1900	2830	2500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440	166	200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370	185	400
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	400	—
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	—	300
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	1,6	5,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9	4,4	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6	1,5	1,0
KI	0,83	0,8	1,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25	—	0,1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025	—	0,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025	—	0,1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	15,0
$\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37,2	37,2	20,0
Myo- inositol	100,0	—	100,0
Glicina	2,0	2,0	2,0
Acido nicotínico	0,5	0,5	0,5
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5
Tiamina HCl	0,1	1,0	0,1

## MEDIO DE CULTIVO PARA LA INICIACION DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS.

### MEDIO MA-1

Medio de MS + 1 mg/l ANA  
 1 mg/l AIA  
 1 mg/l biotina  
 4 mg/l 2,4 - D  
 30 g/l sacarosa  
 6 g/l agarosa  
 pH 5,7

## MEDIOS DE CULTIVO PARA LAS SUSPENSIONES CELULARES.

	MA-2	MA-2 mod	Pi-230	MA-1 Pi-2	N6-2,4D
Macros	MS	MS	MS	MS	N6
Micros	MS	MS	MS	MS	N6
Vitaminas	MS	MS	MOREL	MS	N6
Hierro	MS	MS	MS	MS	N6
Biotina (mg)	1	1	-	1	-
Glutamina (mg)	100	100	-	-	-
Ext.malta (mg)	100	100	-	-	-
2,4 - D (mg)	1	-	-	-	1
Picloram (mg)	-	1	2	2	-
ANA (mg)	-	-	-	1	-
AIA (mg)	-	-	-	1	-
Sacarosa (g)	45	45	30	30	30
pH	5,3	5,3	5,7	5,7	5,7

## MEDIOS DE CULTIVO USADOS EN EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL

MULTIPLICACION (Ma1-Pi2)	GERMINACION (G)
Medio de MS	Medio de MS
1 mg de ANA	0,5 mg de BAP
1 mg de AIA	2,0 mg de AIA
1 mg de biotina	
2 mg de picloram	
30 g de sacarosa	30 g de sacarosa
pH 5,7	pH 5,7

## MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACION EN PLATOS PETRI

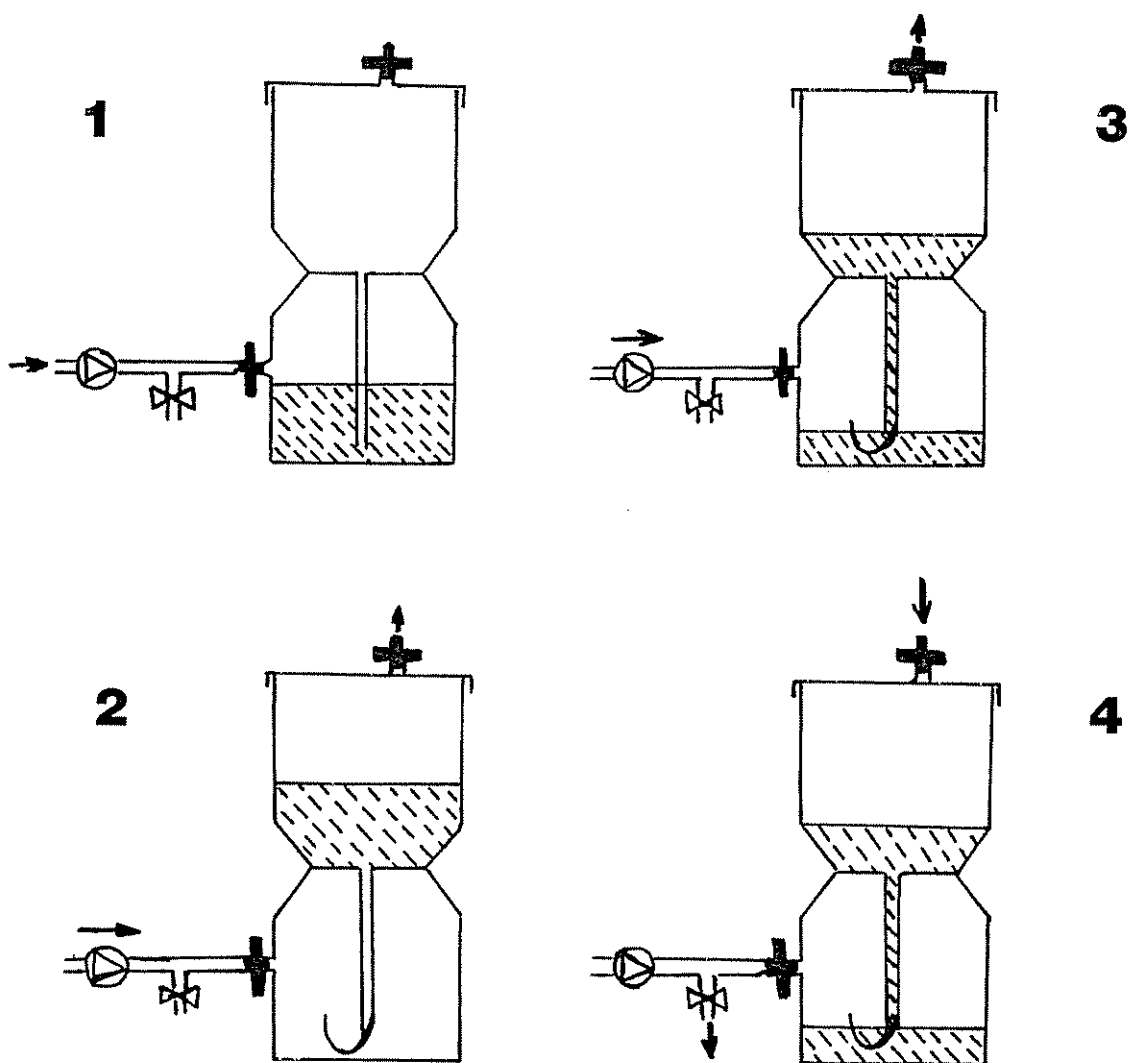
MA-3	GERMINACION (G)
Medio de SH	Medio de MS
0,05 mg zeatina	0,5 mg BAP
0,2 mg ANA	2,0 mg AIA
0,2 mg 2 ip	30 g sacarosa
0,1 mg cinetina	
1,0 mg biotina	pH 5,7
100 mg glutamina	
100 mg extracto de malta	
230 mg prolina	
10 g lactosa	
45 g sacarosa	
pH 5,3	

## FORMULACION DE LAS VITAMINAS DE MOREL

	mg/l
Pantotenato de calcio	1,0
Myo- inositol	100,0
Acido nicotínico	1,0
Tiamina HCl	1,0
Piridoxina HCl	1,0
Biotina	0,01

### Fuentes:

- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y. 1975. *Scientia Sinica* 18: 659-668.
- MARROQUIN, C.G.; 1991. Suspensiones celulares y embriogénesis somática en *Musa acuminata* ssp *malaccensis*. Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 102 p.
- MOREL, G. 1950. *Comptes Rendus de l' Academie des Sciences* 230: 1099-1101.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. *Physiologia Plantarum* 15: 437- 497.
- SCHENK, R.U.; HILDEBRANDT, A.C. 1972. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- SHII, C.T.; MA, S.S; HUANG, I.C.; CHING, W.S. 1992. *In* International Symposium on recent development in banana cultivation technology. Program and Abstracts. 14-18 diciembre 1992. Taiwan Banana Research Institute, Pintung, Taiwan p. 21-22.



Anexo 2. Esquema del sistema de inmersión temporal.

1. Se ejerce presión del aire en el compartimiento inferior. El aire pasa por un filtro de  $22 \mu\text{m}$ .
2. Por efecto de la presión de aire el medio se desplaza hacia el compartimiento superior a través de un tubo de vidrio.
- 3 y 4. Cuando se libera la presión de aire el medio baja por gravedad.



### Anexo 3. PREPARACION DE CORTES HISTOLOGICOS.

#### 1. Cortes en parafina.

1.1. Fijación: Formalina- Alcohol -Acido Acético (10:80:10 ) durante 48 horas.

#### 1.2. Deshidratación.

Ethanol 50 %	1 hora
Ethanol 70 %	1 hora
Ethanol 80%	1 hora
Ethanol 90 %	1 hora
Ethanol 95 %	1 hora
Ethanol 100 %	1 hora
Ethanol 100 %	1 hora
Ethanol 100 % + Tolueno(1:1)	30 min
Tolueno puro	1 hora
Tolueno puro	1 hora

#### 1.3. Infiltración en parafina

Tolueno + parafina (1:1)	30 min
Parafina pura	1 hora
Parafina pura	1 hora
Parafina pura	1 hora

1.4. Inclusión en bloques de parafina y cortes en microtomo 9  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes se fijan en portaobjetos, con formalina a 45- 50 ° C.

#### 1.5. Desparafinación.

Xileno puro	10 min
Xileno puro	5 min
Xileno + ethanol 100 % (1:1)	5 min
ethanol 100 %	3 min
ethanol 95 %	3 min
ethanol 70 %	3 min

### 1.6. Coloración cuadruple.

Safranina al 2 %	30 min
Agua	5 seg
violeta cristal al 1 %	90 seg
ethanol 100 %	3 min
ethanol 100 %	3 min
Orange G + fast green en aceite de clavo	2 min
Orange Green aceite de clavo	2 min
Orange Green aceite de clavo	2 min
Xileno + Ethanol 100 % (1:1)	5 min
Xileno	10 min
Xileno	10 min

#### Interpretación de la tinción:

Las estructuras lignificadas, suberizadas, cutinizadas y estructuras nucleares tiñen en rojo. La lámina media, estructuras pécticas y el almidón tiñen violeta. Los tejidos degenerados y diversas estructuras tiñen en naranja. Las paredes celulares y el citoplasma se tiñen de verde.

### Coloración con Fabil

- (A) 0,5% azul de anilina en lactofenol
- (B) 0,5% p/v fuchsina básica en lactofenol
- (C) 0,3% p/v yodo + 0,6 yoduro de potasio en lactofenol

Las soluciones se mezclan en proporción 4A + 3B +3C para obtener una dilución final de 0,2 % p/v de azul de anilina, 0,15 % p/v fuchsina básica, 0,1 % p/v yodo, 25 % v/v de ácido láctico, 25 % p/v de fenol, 25 % v/v glicerina y 25 % v/v de agua. Las proporciones de ácido láctico, fenol, glicerina y agua pueden variar sin afectar el resultado.

Interpretación de la tinción: Las proteínas y la calosa se tiñen de azul, el almidón de pardo oscuro y las paredes lignificadas, suberizadas y cutinizadas tiñen de rojo.