

Embriogénesis Somática en Plátanos y Bananos: **Perspectivas y limitaciones**

El Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) es un centro regional dedicado a la investigación y la enseñanza de posgrado en agricultura, manejo, conservación y uso sostenible de los recursos naturales. Sus miembros regulares son el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Belice, Bolivia, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, República Dominicana y Venezuela.

La Corporación Bananera Nacional (CORBANA) es una institución pública sin fines de lucro, la cual tiene dentro de sus objetivos fortalecer la investigación en el cultivo del banano, incrementar la productividad bananera con un mínimo de riesgo ambiental, brindar servicios de investigación, asistencia técnica e información sobre precios y mercados. Asimismo, centralizar la información sobre el banano para promover y fomentar la participación en la investigación y en el desarrollo tecnológico del sector bananero nacional.



María Elena Aguilar V.
Juan Luis Ortiz V.
Jorge Arturo Sandoval F.







Embriogénesis Somática en Plátanos y Bananos: Perspectivas y limitaciones.

**María Elena Aguilar V.¹
Juan Luis Ortiz V.¹
Jorge Arturo Sandoval F.²**

**¹Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
Grupo Temático "Manejo y Uso Sostenible de Recursos
Fitogenéticos" Laboratorios de Biotecnología
Turrialba, Costa Rica.**

**²Corporación Bananera Nacional (CORBANA)
Dirección de Investigaciones. Laboratorio de Biotecnología.
Guápiles, Pococí, Costa Rica.**

2008

II

634.773

A283 Aguilar V., María Elena

Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones / María Elena Aguilar V., Juan Luis Ortiz V. y Jorge Arturo Sandoval F. – 1 ed. – Turrialba, C.R : CATIE, 2008.
50 p. : il. – (Serie técnica. Boletín técnico / CATIE ; no.27)

ISBN 978-9977-57-460-8

1. Musa (plátanos) – Embriogénesis somática – Cultivo in vitro
 2. Musa (bananos) – Embriogénesis somática – Cultivo in vitro
- I. Ortiz V., Juan Luis II. Sandoval F., Jorge Arturo III. CATIE
IV. Título VIII. Serie.

III

El Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) es un centro regional dedicado a la investigación y la enseñanza de posgrado en agricultura, manejo, conservación y uso sostenible de los recursos naturales. Sus miembros regulares son el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Colombia, Belice, Bolivia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, República Dominicana y Venezuela.

La Corporación Bananera Nacional (CORBANA) es una institución pública sin fines de lucro, la cual tiene dentro de sus objetivos fortalecer la investigación en el cultivo del banano, incrementar la productividad bananera con un mínimo de riesgo ambiental, brindar servicios de investigación, asistencia técnica e información sobre precios y mercados y fomentar el desarrollo tecnológico del sector bananero nacional.

CONTENIDO

Presentación	VIII
I. Introducción	1
1. Investigación colaborativa: Laboratorios de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA)	1
2. ¿Qué es la embriogénesis somática (ES)?	2
3. Generalidades de la ES en musáceas	4
4. Embriogénesis somática a partir de flores femeninas y flores masculinas.....	4
II. Establecimiento de callos embriogénicos	5
1. Colecta de explantes (flores masculinas).....	5
1.1. Aislamiento y desinfección de flores masculinas (manitas)	5
2. Colecta de explantes (flores femeninas).....	8
2.1. Aislamiento y desinfección de yemas florales femeninas.....	8
3. Inducción de la ES.....	11
4. Evaluación y selección de callos embriogénicos	11

III. Establecimiento y manejo de suspensiones celulares embriogénicas (SCE).....	14
1. Iniciación de una suspensión celular	14
2. Subcultivo y mantenimiento de la SCE	15
3. Curva de crecimiento celular.....	17
4. Evaluación de la calidad de la SCE	18
IV. Regeneración celular.....	19
V. Germinación de embriones y conversión en planta.....	21
1. Germinación en medio M4 sólido	21
2. Germinación en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA).....	22
VI. Desarrollo de plantas	23
VII. Aclimatación	24
VIII. Etapa de vivero	26
IX. Evaluación de la estabilidad genética de las plantas regeneradas	28
X. Perspectivas de la ES	30
XI. Limitaciones de la ES	32

VI

XII.Glosario 34

XIII. Lista de abreviaturas y acrónimos 43

XIV.Referencias 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Chiras (a). Disección de chiras (b). Aislamiento del ápice floral (c). Desinfección (d). Disección del ápice floral (e). Aislamiento de manitas o flores (f-g). Manitas (h) 7

Figura 2. Aislamiento de yemas florales femeninas. Selección de la planta apropiada (a). El vástago es cortado a 1 m de altura y luego en la base (b). Eliminación de hojas del pseudotallo (c). Abultamiento del pseudotallo como indicativo de la presencia de flores diferenciadas (d). Reducción del tamaño del ápice floral a 5 cm (e). Remoción de brácteas en asepsia (f). Extracción de flores o manitas (g). 10

Figura 3. Tipos de callos obtenidos durante la embriogénesis somática de musáceas. Necrosamiento y engrosamiento del explante (a). Desarrollo de callos no embriogénicos de apariencia nodular (b). Callos compactos, no embriogénicos color blanco cristalino (c). Callos embriogénicos compactos (ce), con embriones individuales (d). Callo embriogénico friable (ci) o callo ideal (e, f). 13

Figura 4. Inicio de la suspensión celular en cajas multihuecos (a). Subcultivo en erlenmeyer de 250 ml (b,c). Cultivo en agitadores rotatorios a 100 rpm (d) 15

- Figura 5.** Subcultivo y mantenimiento de la suspensión celular. Filtración de la SCE mediante el uso de un tamiz (a). Subcultivo y filtración de la SCE con pipetas graduadas (b,c) 16
- Figura 6.** Curva de crecimiento celular de una suspensión celular embriogénica 17
- Figura 7.** Suspensión celular embriogénica, mostrando agregados celulares (a). Corte histológico mostrándo los proembriones en una suspensión celular embriogénica (b) ... 18
- Figura 8.** Regeneración de una suspensión celular embriogénica sobre papel filtro (a,b). Regeneración de masas embriogénicas (c,d) 20
- Figura 9.** Germinación de embriones somáticos en medio sólido. Embriones con la muesca claramente definida (a). Selección de embriones (b). Embriones en curso de germinación (c). Embriones germinados (d) 22
- Figura 10.** Embriones somáticos en proceso de germinación en RITA (a). Acercamiento (b) 23
- Figura 11.** Desarrollo de plantas regeneradas en medio sólido (a). Desarrollo de plantas regeneradas en medio líquido en RITA (b,c) 24
- Figura 12.** Lavado de vitroplantas (a) y eliminación de restos de agar antes de la aclimatación (b) 25

VIII

Figura 13. Aclimatación de plantas. Plantas listas para su aclimatación (a). Siembra de plantas en bandeja (b, c). Bandeja completa (d). Bandejas dentro de cámaras de plástico en condiciones de alta humedad relativa (e) 26

Figura 14. Plantas listas para el trasplante (a). Preparación de bolsas (b). Desarrollo de plantas en bolsa en el vivero (c, d y e) 27

Figura 15. Plantas del Tipo Falso Cuerno (cv 'Curraré') procedentes de embriogénesis somática en fase de crecimiento vegetativo (a) y fructificación (b) 29

Figura 16. Plantas del Tipo Francés (cv 'Dominico') en fase de fructificación (a). Obsérvese la buena conformación del racimo (b) 30

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su sincero agradecimiento a los productores locales de banano y plátano, por el aporte desinteresado del material vegetal necesario para realizar las diferentes etapas de la investigación, que permitieron el desarrollo de estas metodologías biotecnológicas. Al personal de los Laboratorios de Biotecnología del CATIE y de la Sección de Agrofisiología de CORBANA, quienes hicieron aportes sustanciales a este desarrollo.

Se ofrece un agradecimiento particular a los revisores técnicos del documento:

A la Dra. Ana Abdelnour Esquivel, del Centro de Investigaciones en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por la cuidadosa revisión técnica y las acertadas sugerencias y comentarios para mejorar el texto. Al Ing. Alfonso Vargas Calvo, de la Sección de Agrofisiología de CORBANA por su valioso aporte en la revisión técnica y recomendaciones.

Al MBA Rigoberto Aguilar Martínez de la Biblioteca ORTON (IICA-CATIE) por su tiempo dedicado a la revisión rigurosa de la lista de referencias.

Finalmente, extendemos nuestro agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido al desarrollo de este documento.

PRESENTACIÓN

El Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en colaboración con el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD), instituto francés, desarrollaron un programa de investigación en biotecnología de Musáceas, durante la década de los noventa. Producto de esta colaboración, numerosos proyectos de investigación fueron realizados permitiendo el desarrollo de metodologías como la embriogénesis somática a partir de flores masculinas y femeninas inmaduras en diferentes cultivares de *Musa*; el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas y el cultivo en inmersión temporal utilizando recipientes NALGENE®. Durante este periodo de investigación se establecieron bases sólidas para aplicar la embriogénesis somática a gran número de cultivares de interés genético y comercial.

Posteriormente, a partir del año 2000, nuevos proyectos y alianzas permitieron ampliar el conocimiento en estas metodologías, trabajar en la optimización de las diferentes fases de la embriogénesis somática, y en la adaptación del cultivo en inmersión temporal utilizando recipientes RITA, con el objetivo de aplicar esta herramienta a la propagación a gran escala y como base para el mejoramiento genético de los bananos y plátanos. En este sentido, se inició la colaboración con el Centro de Investigación y Estudios Avanzados de México, Unidad Irapuato (CINVESTAV), la cual permitió la capacitación de personal y de estudiantes de ambas instituciones en estas técnicas celulares y

en metodologías de ingeniería genética. Asimismo, se amplió el trabajo en colaboración con la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) de Costa Rica, quién fue clave en la aclimatación de las plantas regeneradas, en el establecimiento de experimentos de campo y en desarrollar la metodología de evaluación de la estabilidad genética de las plantas regeneradas. Del mismo modo, cabe mencionar, la difusión regional que el CATIE ha realizado de estas metodologías formando estudiantes de grado y, posgrado y capacitando investigadores de universidades y centros de investigación de la región.

De esta manera, el CATIE y CORBANA unen esfuerzos y por medio de este boletín técnico contribuyen al desarrollo y aplicación práctica de estas herramientas biotecnológicas, mediante la consulta de estudiantes, investigadores, técnicos y productores de los países de la región.

Los autores



I. Introducción

1. Investigación colaborativa: Laboratorios de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA).

Los Laboratorios de Biotecnología del CATIE fueron creados en la década de los 80. Desde ahí, la investigación en biotecnología de musáceas ha sido una de sus prioridades. El esfuerzo continuo dedicado a la investigación en colaboración nacional e internacional en bananos y plátanos (*Musa*) ha hecho que el CATIE logre un importante desarrollo en el uso y aplicación de técnicas de regeneración celular para estos cultivos. La optimización de la embriogénesis somática en un gran número de cultivares de *Musa* ofrece grandes expectativas para el uso de esta tecnología como plataforma de base para el mejoramiento genético de bananos y plátanos. La identificación y transferencia de genes de interés agronómico y la selección de líneas celulares mejoradas, permitirá reducir el consumo de plaguicidas y facilitará una producción más amigable con el ambiente.

La aplicación de otras herramientas como la crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas y, el cultivo en inmersión temporal permitirán almacenar por tiempo indefinido las líneas celulares seleccionadas, sin riesgo de pérdida de la identidad genética. Además la propagación de estos materiales a gran escala facilitará el acceso del productor a plantas de mejor calidad.

CORBANA ha contribuido y participado en este desarrollo a diferentes niveles, mediante el suministro de semilla de partida para el establecimiento de cultivos embriogénicos y por medio de la evaluación agronómica y de la estabilidad genética de las plantas regeneradas. La certeza de regenerar plantas genéticamente estables es fundamental para medir el éxito de estas metodologías. CORBANA tiene una amplia experiencia en el monitoreo y evaluación de plantas producidas en cultivo *in vitro* y en la identificación de los diferentes tipos de plantas variantes. La sólida alianza de trabajo entre ambas instituciones ha permitido el desarrollo de proyectos conjuntos y la cooperación mutua entre ambas instancias de investigación.

2. ¿Qué es la embriogénesis somática (ES) ?

En plantas, la embriogénesis no está restringida a la fecundación de la célula huevo, también puede ser inducida natural o artificialmente en las células somáticas (células no sexuales). La adquisición de la competencia embriogénica en células somáticas involucra una fase de inducción, la cual no existe en la embriogénesis cigótica (Dodeman *et al.*, 1997). Los primeros hallazgos de embriogénesis somática en laboratorio fueron observados en cultivos de raíces de zanahoria por Stewart *et al.*, (1958) y Reinert (1958).

La embriogénesis somática o asexual *in vitro* es el proceso mediante el cual las células somáticas haploides o diploides se desarrollan en embriones pasando a través de diferentes estados morfológicos característicos de la embriogénesis cigótica, pero sin

la fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986). Un embrión somático se caracteriza por presentar una estructura bipolar, la cual desarrolla precoz y simultáneamente un meristemo de tallo y un meristemo de raíz (Margara, 1988).

Si bien es cierto, el potencial embriogénico de las especies está regulado genéticamente; la expresión de la competencia embriogénica de células somáticas podría tener influencia fisiológica y de otros factores del desarrollo *in vitro*. El hecho de que células somáticas aisladas puedan desarrollarse en embriones, demuestra que el programa de desarrollo de la embriogénesis somática está contenido y es controlado por la célula misma. Sin embargo, la naturaleza exacta del mecanismo disparador de la embriogénesis, sea este físico, bioquímico o genético, es hasta ahora desconocido (Gray, 2000).

La embriogénesis somática es mejor conocida para células de cultivo de tejidos que producen embriones somáticos, mediante una secuencia de desarrollo que va a través de estados bien definidos; los cuales son notablemente similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica, excepto que los embriones somáticos carecen del estado de dormancia (Dodeman *et al.*, 1997). En monocotiledóneas el patrón de desarrollo de los embriones tanto cigóticos como somáticos comprende los estados globular, escutelar y el estado de coleoptilo (Gray, 2000).

La importancia de la ES radica en que permite la posibilidad de multiplicación de genotipos a gran escala. Facilita el cultivo en medios líquidos y favorece la automatización del sistema

de cultivo. Además es una técnica de regeneración celular, la cual, puede ser utilizada como base para el mejoramiento genético no convencional. Permite la conservación a largo plazo (crioconservación) de líneas celulares de interés genético y comercial, facilitando el intercambio internacional de germoplasma *in vitro*.

3. Generalidades de la ES en musáceas.

En musáceas, la embriogénesis somática ha sido obtenida por diferentes vías, mediante el cultivo de embriones cigóticos (Cronauer y Krikorian, 1988; Escalant y Teisson, 1988); tejido foliar y rizoma (Novak *et al.*, 1989); meristemos altamente proliferantes o escalpos (Dhed'a *et al.*, 1991) y a partir de flores masculinas (Ma, 1991) y femeninas (Grapin *et al.*, 1998). Estas dos últimas técnicas han sido las más exitosas, lo cual ha permitido el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas (SCE), la regeneración, germinación de embriones, el desarrollo de plantas y su evaluación en campo.

4. Embriogénesis somática a partir de flores femeninas y flores masculinas.

La embriogénesis somática de flores masculinas de bananos y plátanos obtenida inicialmente por Ma (1991), fue mejorada mediante el establecimiento de SCE a partir de los trabajos realizados por Escalant *et al.*, (1994), Côte *et al.*, (1996) y Grapin *et al.*, (1996); quienes gradualmente fueron aportando

nuevos elementos para el establecimiento en rutina de esta metodología.

Posteriormente, la ES y el establecimiento de SCE fueron logrados en flores femeninas de aquellos cultivares que carecen de chira persistente en el racimo, como el cultivar 'Curraré' (Grapin *et al.*, 1998; Grapin *et al.*, 2000). Esto permitió ampliar el rango de aplicación de la ES a gran cantidad de cultivares del género *Musa*.

II. Establecimiento de callos embriogénicos.

1. Colecta de explantes (flores masculinas).

Las flores masculinas son tomadas de la chira (yema masculina) o inflorescencia persistente en el racimo de plantas conformes seleccionadas en el campo. La colecta de las chiras se realiza de 1 a 10 semanas después de haberse iniciado la floración.

1.1. Aislamiento y desinfección de flores masculinas (manitas).

El aislamiento de manitas o flores masculinas se realiza mediante el procedimiento siguiente (Fig. 1):

- El cultivo puede iniciarse el mismo día de colecta o bien 24 ó 48 horas después.

- Se reduce el tamaño de las inflorescencias hasta obtener ápices florales de 2 cm de longitud.
- La desinfección de los ápices se realiza mediante la inmersión de los mismos en alcohol de 70° (v/v) durante 5 minutos.
- Las manitas o flores inmaduras son tomadas de las posiciones 7 a 16 del ápice floral, tomando como referencia la posición 1, la cual corresponde a la flor más cercana al domo meristemático.
- Las flores aisladas son colocadas sobre una superficie estéril y seguidamente son cultivadas en el medio de cultivo respectivo (M1).

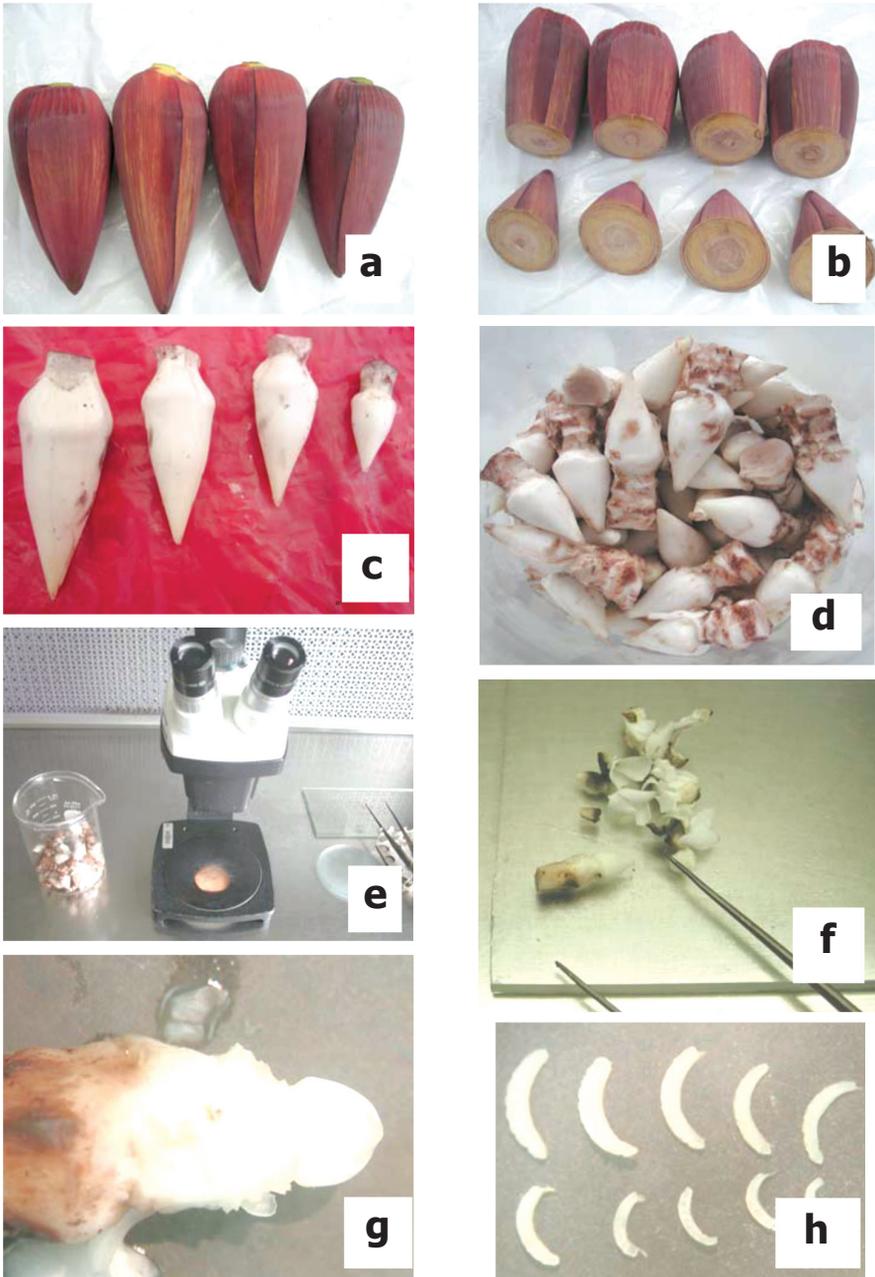


Figura 1. Chiras (a). Disección de chiras (b). Aislamiento del ápice floral (c). Desinfección (d). Disección del ápice floral (e). Aislamiento de manitas o flores (f-g). Manitas (h).

2. Colecta de explantes (flores femeninas).

En algunos cultivares como el 'Curraré' o 'Falso Cuerno' la inflorescencia o chira no persiste en el racimo, por lo que las flores masculinas no pueden ser utilizadas para la inducción de la ES. Por lo tanto, en estos cultivares deben utilizarse las flores femeninas.

2.1. Aislamiento y desinfección de yemas florales femeninas.

Las flores femeninas deben ser cosechadas antes de la formación de los frutos, de acuerdo al procedimiento siguiente (Fig. 2):

- Se seleccionan plantas en buen estado de desarrollo con aproximadamente 7 meses de edad, sin haber emitido la inflorescencia y cuando las flores se encuentren en el proceso de transición del estado vegetativo al estado floral.
- El vástago debe ser cortado a 1 m de altura y posteriormente en la base.
- Se procede a abrir el pseudotallo y a eliminar las hojas.
- Se seleccionan aquellas secciones de pseudotallo de aproximadamente 10 cm de longitud que presentan un ligero abultamiento (indicativo de la presencia de la yema floral) y que por lo tanto poseen flores diferenciadas (en otros casos se presenta el estado vegetativo).
- Los ápices florales de 10 cm se reducen a un tamaño de aproximadamente 5 cm y luego son desinfectados en alcohol de 70° (v/v) durante 5 minutos.
- Las brácteas de estos brotes son removidas dentro de la campana de flujo laminar.

- Con la ayuda de un estereoscopio y un escalpelo de hoja fina (N° 11) se extraen las flores (manitas) y se colocan sobre una superficie estéril.
- Las yemas no diferenciadas en flores son eliminadas y se cultivan únicamente aquellas que presentan flores de aproximadamente 3 mm.

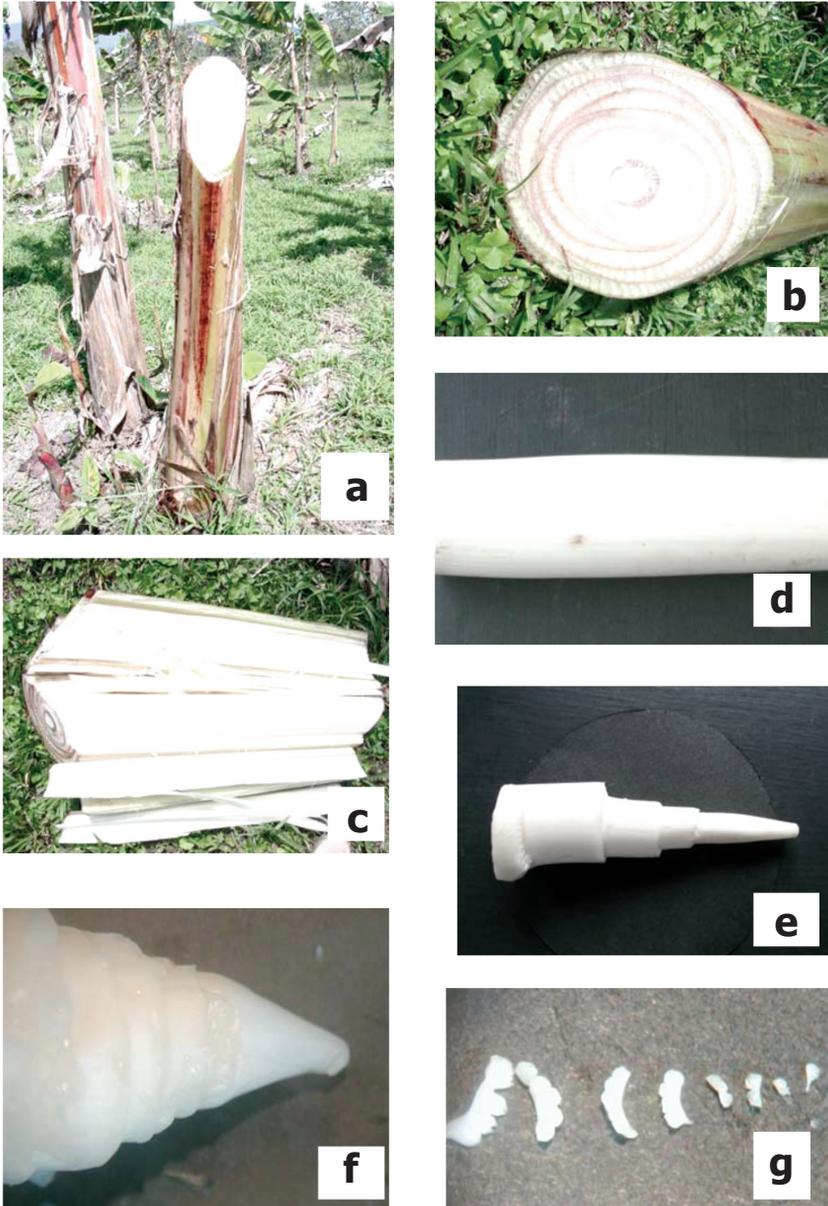


Figura 2. Aislamiento de yemas florales femeninas. Selección de la planta apropiada (a). El vástago es cortado a 1m de altura y luego en la base (b). Eliminación de hojas del pseudotallo (c). Abultamiento del pseudotallo como indicativo de la presencia de flores diferenciadas (d). Reducción del tamaño del ápice floral a 5 cm (e). Remoción de brácteas en asepsia (f). Extracción de flores o manitas (g).

3. Inducción de la ES.

El proceso de inducción de la ES y las fases posteriores de desarrollo son similares tanto en flores masculinas como femeninas. Las manos de flores de tamaño inferior a 3 mm son colocadas en frascos de cultivo con el medio de inducción de la embriogénesis somática (M1).

Medio M1.
• Macroelementos, microelementos de Murashige y Skoog (MS, 1962).
• FeEDTA MS
• Vitaminas de MS .
• Biotina (4.1 μ M)
• Acido 2,4 - diclorofenoxiacético (18 μ M, 2,4-D)
• Acido indolacético (5.7 μ M, AIA)
• Acido naftalenacético (5.4 μ M, ANA)
• Sacarosa (90 mM)
• pH 5.7
• Agarosa (7 g/l).

Los frascos son sellados con papel adhesivo transparente y colocados en cuartos de cultivo bajo luz indirecta a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta la aparición de los diferentes tipos de callo, lo cual varía entre 4 y 6 meses en función del cultivar.

4. Evaluación y selección de callos embriogénicos.

El tiempo de aparición de callo embriogénico (CE) y callo embriogénico friable (CI) varía en el tiempo dependiendo del

cultivar. No obstante, se recomienda una evaluación mensual de los cultivos durante los tres primeros meses, seguido de evaluaciones cada 15 días. La evolución del explante hasta la aparición de callos embriogénicos se manifiesta a través de una secuencia de eventos los cuales se ilustran en la Fig. 3. Durante el primer mes de cultivo se observa la oxidación de tejido y engrosamiento del explante, así como la formación de un callo de cicatrización (a). Después del primer mes de cultivo se observa el desarrollo de callos de color amarillo no embriogénicos; estos callos tienen apariencia nodular y no son utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares (b). También se pueden formar callos compactos de color blanco cristalino no embriogénicos (c) y callos embriogénicos (CE) formados por embriones individuales y callos compactos (d). Estos callos no son utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares. Después del cuarto mes de cultivo y dependiendo del cultivar puede darse el desarrollo de callo embriogénico de naturaleza friable, llamado callo ideal (CI) debido a que es el callo ideal para iniciar una suspensión celular embriogénica. Este callo está conformado por masas proembriogénicas de color blanco-translúcido (e-f).

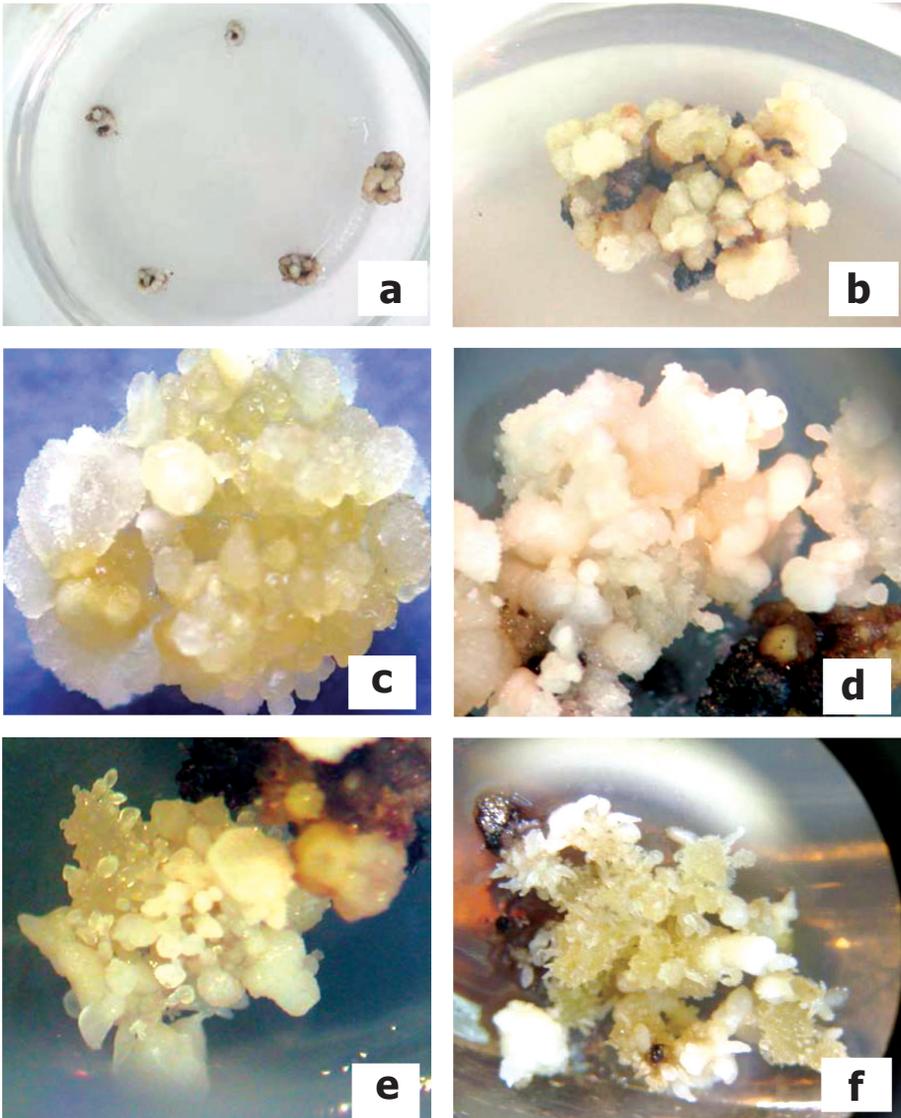


Figura 3. Tipos de callos obtenidos durante la embriogénesis somática de musáceas. Necrosamiento y engrosamiento del explante (a). Desarrollo de callos no embriogénicos de apariencia nodular (b). Callos compactos, no embriogénicos color blanco cristalino (c). Callos embriogénicos compactos (CE), con embriones individuales (d). Callo embriogénico friable (CI) o callo ideal (e, f).

III. Establecimiento y manejo de suspensiones celulares embriogénicas (SCE).

1. Iniciación de una suspensión celular.

Una vez identificado el CI se procede a la iniciación de la suspensión celular embriogénica (SCE). La calidad de una SCE va depender de la calidad del callo embriogénico y del rigor con que se maneje el establecimiento del cultivo. Los callos seleccionados deben estar conformados por masas proembriogénicas, formadas de estructuras globulares pequeñas, de base friable, de naturaleza translúcida. La SCE se inicia en cajas multihuecos de seis cavidades, cada una de las cuales es cubierta por 5 ml de medio de cultivo M2. Conforme incrementa el volumen celular se procede a evaluar la calidad de la suspensión, a seleccionar aquellos agregados más idóneos para establecer una SCE homogénea, y se procede a realizar subcultivos en recipientes de mayor tamaño. Los recipientes son colocados en los cuartos de cultivo sobre agitadores rotatorios con una velocidad de rotación de 100 rpm y en luz indirecta (Fig. 4).

Medio M2.
Macroelementos, microelementos Murashige y Skoog (MS, 1962).
FeEDTA MS
<ul style="list-style-type: none"> • Vitaminas de MS. • Biotina (4.1 μM) • Glutamina (680 μM) • Extracto de malta (100 mg/l) • Acido 2,4 - diclorofenoxiacético (4,5 μM, 2,4 - D) • Sacarosa (130 mM)

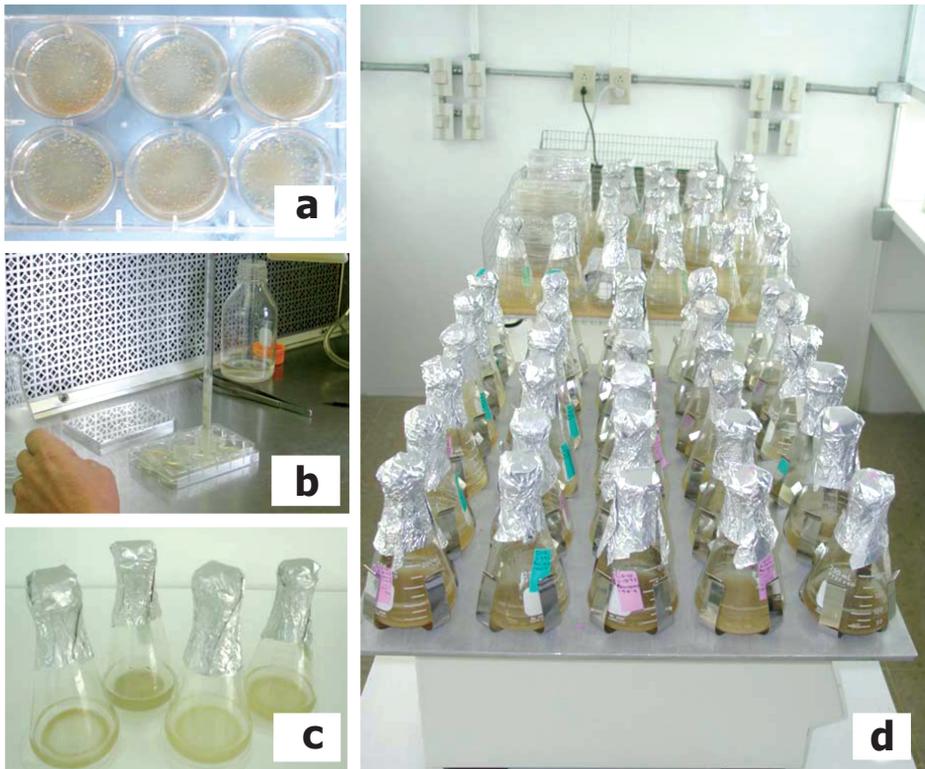


Figura 4. Inicio de la suspensión celular en cajas multihuecos (a). Subcultivo en erlenmeyer de 250 ml (b,c). Cultivo en agitadores rotatorios a 100 rpm (d).

2. Subcultivo y mantenimiento de la SCE.

Debido al aumento de volumen celular en el tiempo, es necesario realizar subcultivos, hacer cambios a medio fresco e iniciar nuevas suspensiones. Durante el primer mes de establecimiento el medio se cambia cada semana, posteriormente la mitad del medio es renovada cada dos semanas. En cada subcultivo, se conserva parte del volumen de cultivo inicial, como medio de pre-acondicionamiento. El volumen celular utilizado al

inicio de cada subcultivo es de 1.5 ml de SCV (Volumen de Células Establecidas) y por lo general se utilizan erlenmeyers de 250 ml, a los cuales se les adiciona 50 ml de medio líquido. Durante cada subcultivo, la suspensión es filtrada mediante el uso de un tamiz o de pipetas graduadas, con el fin de eliminar aquellos componentes celulares que no cumplen con las características óptimas para establecer una SCE. Además la SCE debe ser constantemente monitoreada para evitar el uso de muestras contaminadas (Fig. 5).

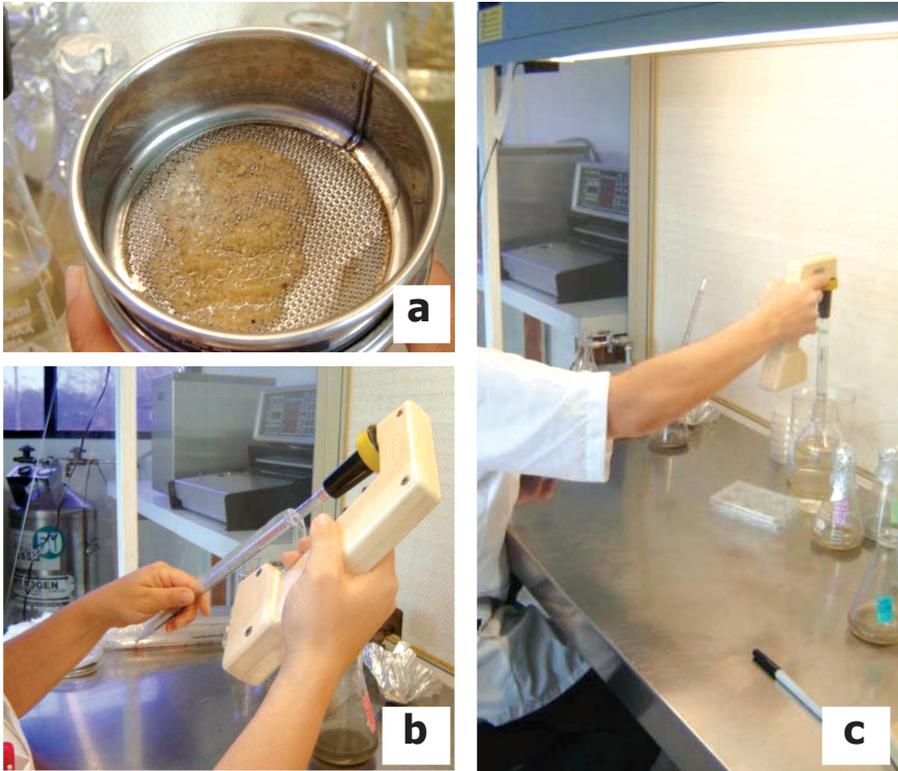


Figura 5. Subcultivo y mantenimiento de la suspensión celular. Filtración de la SCE mediante el uso de un tamiz (a). Subcultivo y filtración de la SCE con pipetas graduadas (b,c).

3. Curva de crecimiento celular.

Para determinar la dinámica de crecimiento de una SCE y definir el tiempo adecuado de subcultivo se establece la curva de crecimiento de la suspensión (Fig. 6). Para esto se toman 1.5 ml de células (SCV) y se colocan en 50 ml de medio M2 líquido. El crecimiento de la suspensión se mide por determinación del cambio en el volumen celular para cada intervalo de evaluación (5 días), durante 40 días. Para cada intervalo se establecen 4 repeticiones. El valor de SCV es obtenido por decantación de las células en un tubo graduado durante 10 minutos.

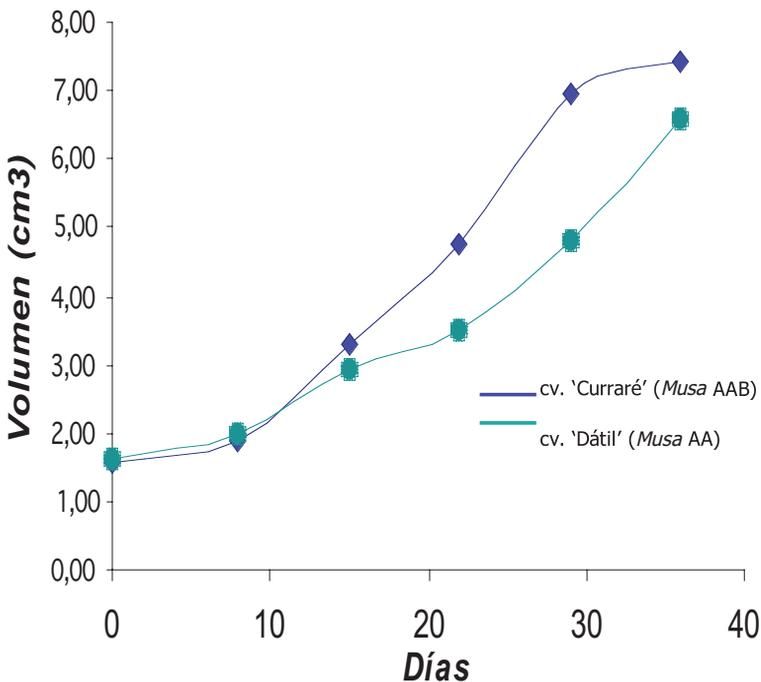


Figura 6. Curva de crecimiento celular de una suspensión celular embriogénica.

4. Evaluación de la calidad de la SCE.

La calidad de una SCE se determina mediante la evaluación rutinaria de su constitución celular (tipos celulares), la coloración, la tasa de multiplicación y el poder de regeneración (Fig. 7).

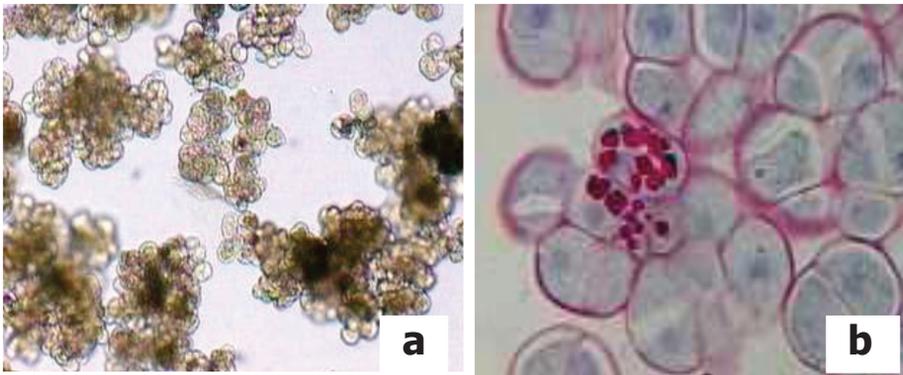


Figura 7. Suspensión celular embriogénica, mostrando agregados celulares (a). Corte histológico mostrándo los proembriones en una suspensión celular embriogénica (b).

IV. Regeneración celular.

La regeneración celular se realiza mediante el cultivo de 1,0 ml de SCE en medio sólido de regeneración (M3).

Medio M3
• Macroelementos, microelementos Schenk y Hildebrandt (SH, 1972)
• Vitaminas de MS.
• FeEDTA SH
• Biotina (4.1 μM)
• Glutamina (680 μM)
• Prolina (2 mM)
• Extracto de malta (100 mg/l)
• Acido naftalenacético (1.1 μM , ANA)
• Zeatina (0.2 μM)
• Kinetina (0.5 μM)
• 2-isopenteniladenina (0.7 μM , 2-iP)
• Sacarosa (130 mM)
• Lactosa (29 mM)
• pH 5.3
• Gelrite (2 g/l)

La SCE se deposita sobre papel filtro colocado sobre el medio de cultivo de una caja Petri de 90 mm, conteniendo 20 ml de medio M3. Los cultivos son colocados en presencia de luz indirecta. Al cabo de 22 a 30 días comienza a observarse la masa de embriones y su incremento sobre el papel filtro (Fig. 8).

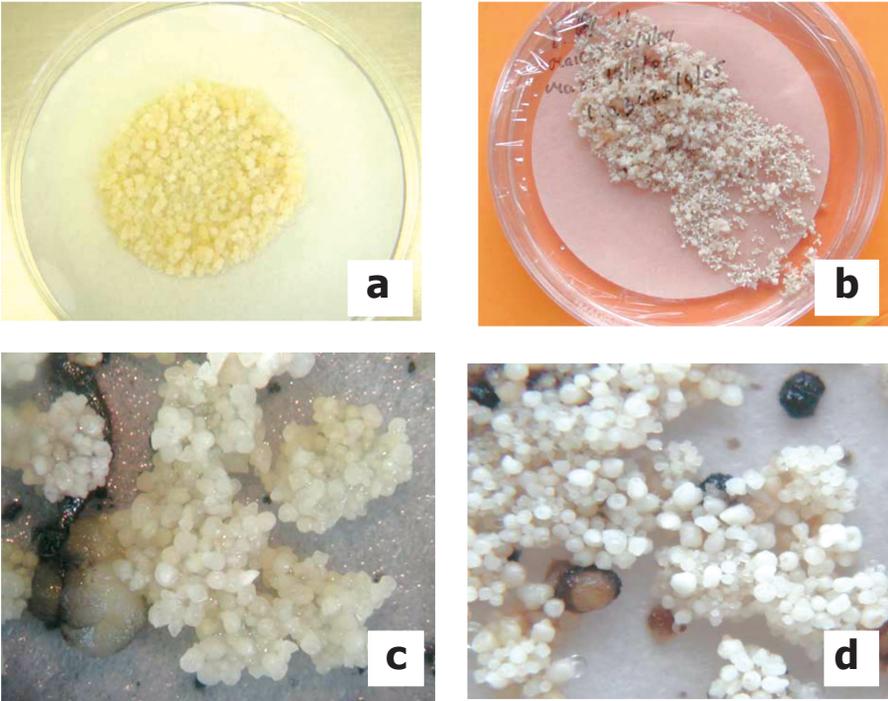


Figura 8. Regeneración de una suspensión celular embriogénica sobre papel filtro (a,b). Regeneración de masas embriogénicas (c,d).

V. Germinación de embriones y conversión en planta.

Cuando el cultivo en el medio de regeneración (M3) muestre los embriones bien diferenciados y éstos presenten la muesca claramente definida se procederá a aislarlos y cultivarlos en el medio de germinación M4 sólido ó líquido en inmersión temporal. Los cultivos son mantenidos en cuartos de crecimiento a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12 horas.

Medio M4
• Macroelementos, microelementos Murashige y Skoog (MS, 1962).
• FeEDTA MS
• Vitaminas de MS.
• 6-benzilaminopurina (0.2 μM , BAP).
• Acido indolacético (1.1 μM , AIA)
• Sacarosa (87 mM)
• pH 5.8
• Gelrite (4 g/l)

1. Germinación en medio M4 sólido.

Los embriones bien diferenciados son aislados del medio de regeneración y cultivados en cajas Petri de 90mm conteniendo 25 ml de medio sólido de germinación (Fig. 9). Los embriones son mantenidos en este medio por un periodo de aproximadamente 6 a 8 semanas.

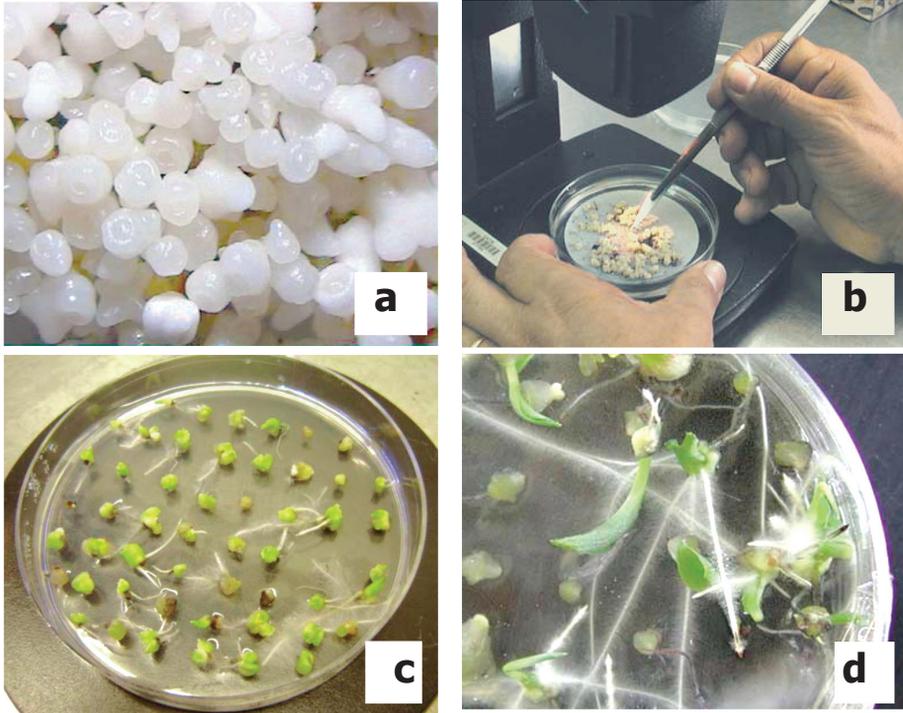


Figura 9. Germinación de embriones somáticos en medio sólido. Embriones con la muesca claramente definida (a). Selección de embriones (b). Embriones en curso de germinación (c). Embriones germinados (d).

2. Germinación en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA).

El cultivo en RITA permite la germinación de gran número de embriones en el mismo recipiente y facilita el manejo masivo de los mismos (Fig. 10). El procedimiento a seguir consiste en colocar 0,5 g de embriones diferenciados en la parte superior del recipiente y 200 ml de medio M4 líquido en la parte inferior. Se utiliza una frecuencia de inmersión de 2 veces al día y un tiempo de inmersión de un minuto.

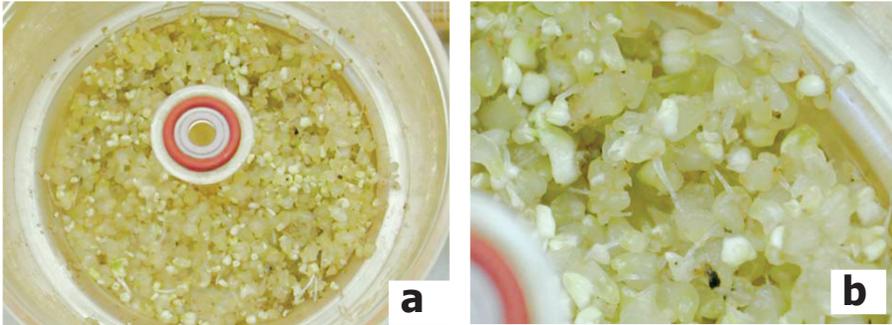


Figura 10. Embriones somáticos en proceso de germinación en RITA (a). Acercamiento (b).

VI. Desarrollo de plantas.

La fase de desarrollo de los embriones se realiza en medio de cultivo sólido o en RITA. Consiste en la siembra de los embriones germinados en el medio de desarrollo, en el cual las plantas permanecen de 4 a 6 semanas. El cultivo en medio sólido requiere del subcultivo individual de los embriones a un nuevo recipiente (Fig. 11a). El cultivo en RITA consiste en el cambio de medio líquido de germinación (M4) por el medio de desarrollo y en algunos casos la división del material en varios recipientes RITA (Figs. 11b y c).

Medio de Desarrollo

- Macroelementos, microelementos Murashige y Skoog (MS, 1962).
- FeEDTA MS
- Vitaminas MS.
- Sacarosa (87 mM)
- pH 5.7
- Gelrite (2 g/l)

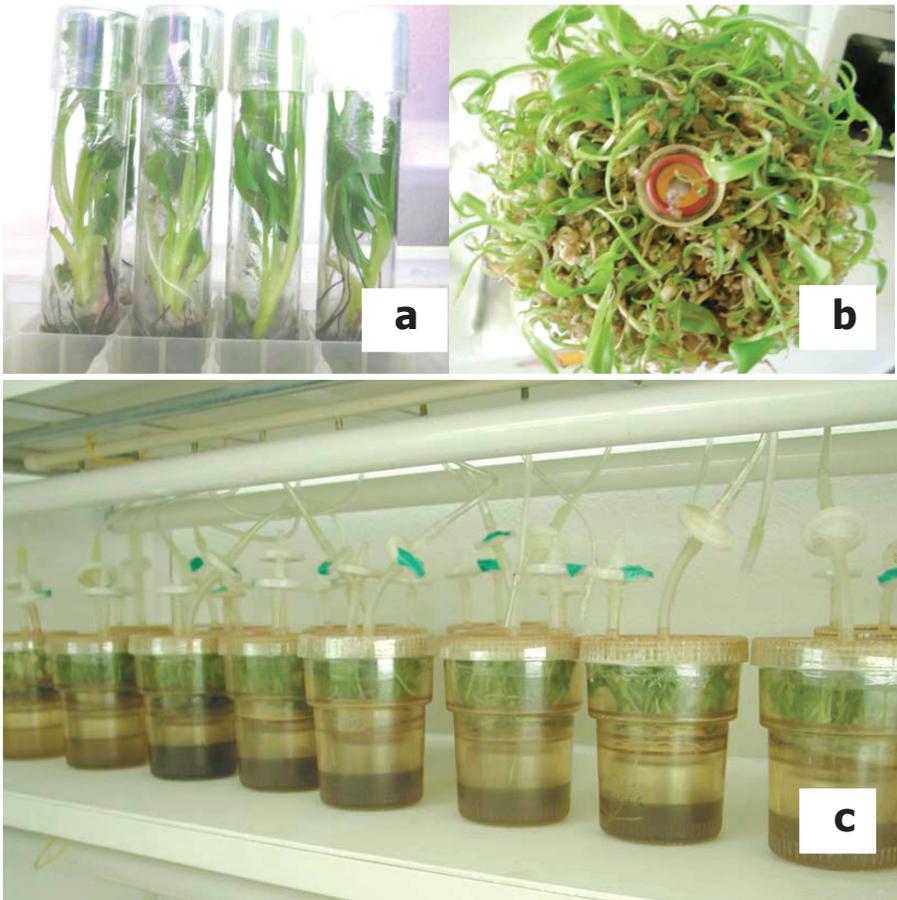


Figura 11. Desarrollo de plantas regeneradas en medio sólido (a). Desarrollo de plantas regeneradas en medio líquido en RITA (b,c).

VII. Aclimatación.

La aclimatación se realiza mediante la extracción de las plantas de los frascos de cultivo y la eliminación del exceso de agar en el caso de las plantas procedentes de medio de cultivo sólido (Fig. 12).



Figura 12. Lavado de vitroplantas (a) y eliminación de restos de agar antes de la aclimatación (b).

Las plantas son sembradas en bandejas de plástico de 72 pozos y sobre sustrato estéril compuesto por suelo y fibra de coco (1:3), al cual se le adiciona fertilizante de liberación controlada (Osmocote®), fórmula completa (7g / bandeja). Las plantas se siembran manualmente con la ayuda de una pinza y las bandejas se colocan dentro de cámaras de plástico en el invernadero en condiciones de alta humedad relativa (cerca al 100%) durante 6 semanas (Fig. 13). El riego es por aspersión, se aplica dos veces al día, con una duración de dos minutos cada vez.

Una semana después de la siembra en invernadero, se inicia el ciclo de fertilización foliar, el cual se realiza dos veces por semana (5 g/l de fertilizante 20-20-20 + 2.5 g/l de Sulfato de Magnesio). Para prevenir el ataque de hongos e insectos se hacen aplicaciones de fungicidas e insecticidas respectivamente.



Figura 13. Aclimatación de plantas. Plantas listas para su aclimatación (a). Siembra de plantas en bandeja (b, c). Bandeja completa (d). Bandejas dentro de cámaras de plástico en condiciones de alta humedad relativa (e).

VIII. Etapa de vivero.

En vivero las plantas son trasplantadas individualmente a bolsas de plástico negras de 7,0 cm de ancho por 5,0 cm de alto

(Fig. 14). Estas bolsas son cubiertas de sustrato constituido por suelo, arena, cal (3:0,5:0,5); ambos componentes son tamizados antes de hacer la mezcla. Dos o tres días después del trasplante se realiza la primera fertilización con Nitrofosca® (2 g) y después de la primera semana en bolsa se aplica fertilizante foliar, dos veces por semana, constituido por sulfato de magnesio (Nutriverde® 2,5 g/l); Foliveex® 20-20-20 (5 g/l) y urea (5 g/l). En caso necesario, se realizan aplicaciones de fungicida o insectida.



Figura 14. Plantas listas para el trasplante (a). Preparación de bolsas (b). Desarrollo de plantas en bolsa en el vivero (c, d y e).

IX. Evaluación de la estabilidad genética de las plantas regeneradas.

Las evaluaciones de la estabilidad genética de las plantas regeneradas fueron realizadas en el Centro Experimental de 28 Millas de CORBANA, en la Zona Atlántica de Costa Rica, por lo tanto, las recomendaciones que se sugieren en este manual son el resultado de esa fase experimental.

Las plantas aclimatadas son sembradas en lotes con un arreglo de "tres bolillo" y un diseño completamente al azar, donde cada planta es considerada una repetición. Las variables cuantificadas son: altura de la planta madre, circunferencia del pseudotallo, número de hojas de la planta madre al momento de la floración y altura del hijo. Cuando se realiza la cosecha se determina el número de hojas, número de manos, y peso del racimo. También se evalúan las variables de calidad como grosor y longitud de las manos 2 y 6. Asimismo, se determinan los tiempos transcurridos entre la siembra y la floración y entre la floración y la cosecha. Durante todo el lapso experimental se realizan evaluaciones morfológicas en forma trimestral con la finalidad de observar posibles variantes o plantas fuera de tipo. Las figuras 15 y 16 muestran las plantas de plátano Tipo Falso Cuerno cv. 'Curraré' (Fig. 15) y Tipo Francés cv. 'Domingo' (Fig. 16), en fase de crecimiento vegetativo y fase de fructificación, respectivamente.



Figura 15. Plantas del Tipo Falso Cuerno (cv `Curraré') procedentes de embriogénesis somática en fase de crecimiento vegetativo (a) y fructificación (b).



Figura 16. Plantas del Tipo Francés (cv 'Dominico') en fase de fructificación (a). Obsérvese la buena conformación del racimo (b).

X. Perspectivas de la ES.

El mejoramiento genético de bananos y plátanos es limitado por la alta esterilidad y los diferentes niveles de ploidía de los cultivares comerciales, los cuales, además son muy vulnerables al ataque de patógenos.

Actualmente los avances en biotecnología, particularmente el desarrollo de la biología celular y molecular, ambas apoyadas en herramientas como la genómica y el mejoramiento genético no

convencional permiten superar estas barreras. No obstante, el éxito de estas aplicaciones depende en gran medida de la eficacia de los sistemas de regeneración celular que permitan hacer una recuperación confiable de las plantas obtenidas producto de estas tecnologías.

En este sentido la embriogénesis somática aumenta las expectativas de los fitomejoradores, debido a que constituye una herramienta muy valiosa, tanto como sistema de regeneración celular de genotipos producto de mejoramiento, como método de propagación vegetativa, el cual debido al elevado potencial de multiplicación, friabilidad y vigor del material embriogénico, presenta muchas ventajas para el uso de cultivos en medio líquido (suspensiones celulares) y para la automatización del sistema de cultivo utilizando técnicas como la inmersión temporal y el cultivo en bioreactores. Esto permite aumentar la escala de producción, reducir el uso de insumos de costo elevado, como los gelificantes tipo agar; acortar el tiempo de labor y la superficie de cultivo en ambientes controlados. Por consiguiente, los costos de producción *in vitro* son menores una vez que la metodología ha sido establecida. Asimismo, representa un medio adecuado para la conservación a largo plazo (crioconservación a -196°C) de líneas celulares de interés en mejoramiento.

Durante más de un quinquenio el CATIE en colaboración con CORBANA ha realizado evaluaciones en campo de la calidad agronómica de plantas producidas por embriogénesis somática con resultados exitosos en la mayoría de los cultivares. La optimización alcanzada en esta técnica se debe a que se ha

combinado el alto potencial de multiplicación de la embriogénesis somática de alta frecuencia, con la utilización de los sistemas de cultivo en medio líquido y en inmersión temporal automatizada; además de la constante mejora y ajuste de protocolos, a los diferentes cultivares.

XI. Limitaciones de la ES.

Entre los problemas asociados a la embriogénesis somática de musáceas se pueden citar los siguientes:

1. Baja frecuencia en la producción de callo embriogénico

en la fase de inducción, la cual varía entre el 1 y el 10% dependiendo del cultivar. Esto posiblemente está asociado a la baja respuesta de la mayoría de células somáticas hacia la competencia embriogénica.

2. Falta de sincronización del desarrollo embriogénico,

es decir, que en fases posteriores a la inducción de la ES, es difícil homogenizar toda la población de embriones hacia el mismo estado de desarrollo. Por lo tanto, en cualquier fase es frecuente observar embriones en todas las etapas de desarrollo embriogénico.

3. Calidad de los embriones somáticos con respecto a anomalías morfológicas y heterogeneidad en el tamaño de los embriones.

4. Mayor probabilidad de obtención de plantas variantes (fuera de tipo), en principio, producto de las altas dosis de 2,4-D, utilizadas durante la inducción o bien de largos periodos de cultivo en suspensión celular.

5. Dificultad de lograr la conversión de embriones a plantas completas; sin embargo, en el caso de musáceas las tasas de conversión en planta superan el 80%.

6. Posibilidad de reversión de algunos cultivares a la morfología de los padres; se ha observado con poca frecuencia y es específica para los plátanos AAB (Reversión de 'Curraré' a 'Dominico').

XII. Glosario.

Aclimatación: Adaptación de un organismo vivo (planta, animal o microorganismo) a un cambio medioambiental que le somete a un estrés fisiológico. No debe confundirse con adaptación.

Agar: Polisacárido que, por sus propiedades gelificantes, se utiliza en la preparación de medios nutritivos para los cultivos. Se obtiene de la *Rhodophyta* (alga roja). Tanto el tipo de agar como su concentración pueden afectar al crecimiento y a la apariencia de los explantes cultivados.

Agarosa: Principal componente funcional del agar.

Agregados celulares: Organización formada por conjuntos o agrupaciones de células débilmente asociadas, los cuales conforman las suspensiones celulares.

Ambiente controlado Entorno cerrado donde parámetros tales como luz, temperatura, humedad relativa y, algunas veces presión parcial de los gases (e incluso su composición), están completamente controlados.

Apice: Parte terminal de la raíz o tallo que contiene el meristemo apical o primario.

Asepcia: Estéril, libre de organismos contaminantes (bacterias, hongos, algas; generalmente no se incluyen virus y, en concreto, no se incluyen simbiosis internos).

Autoclave: Cámara cerrada que permite, mediante la aplicación de calor y vapor a presión, esterilizar distintos objetos y sustancias (material de laboratorio, líquidos, etc.).

Biorreactor: Tanque en el que células, extractos celulares o enzimas llevan a cabo una reacción biológica. Generalmente hace referencia a los recipientes de fermentación para

células o microorganismos.

Biotecnología 1) "Cualquier aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos, o algunos de sus derivados para crear o modificar productos o procesos para usos específicos" (Convenio de Diversidad Biológica).
2) "Interpretado en sentido más estricto, [...] el conjunto de diferentes tecnologías moleculares tales como la manipulación y transferencia de genes, el tipado de ADN y la clonación de plantas y animales" (Declaración de la FAO sobre biotecnología).

Biotecnología moderna: Aplicación de: 1) técnicas *in vitro* de ácidos nucleicos, incluyendo el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos, o 2) fusión de células de la misma o distinta familia taxonómica. Estas técnicas, que no forman parte de las empleadas en la selección y mejora tradicionales, permiten sobrepasar las barreras fisiológicas naturales, ya sean reproductoras o de recombinación (Convenio sobre la Diversidad Biológica).

Bráctea: Hoja modificada situada en la base de la flor o de la inflorescencia con apariencia de pétalo.

Cabina de flujo laminar: Cámara diseñada para mantener el ambiente estéril requerido para trabajar con cultivos de células o tejidos. Se consigue mediante el paso de un flujo continuo no turbulento de aire esterilizado por filtración a través de la zona de trabajo. Sinónimo: campana de flujo laminar.

Callo: 1) Tejido cicatricial formado por células del parénquima que se desarrolla en la superficie de una planta cortada o dañada.
2) Acúmulo de células de parénquima, indiferenciadas y de pared fina, inducido por un tratamiento hormonal.
3) Masas no organizadas de células diferenciadas y no diferenciadas que se dividen activamente a consecuencia

de una herida o bien en un cultivo de tejido mantenido en un medio provisto de factores de crecimiento.

Callo embriogénico (CE): callo embriogénico el cual consiste de embriones individuales.

Callo Ideal (CI): callo friable altamente embriogénico.

Célula huevo: Célula del saco embrional (megagametófito) que se fusiona con un espermatozoides del tubo polínico y da origen al cigoto. Sinónimos: oosfera u ovocélula.

Célula somática: Células no involucradas en la reproducción sexual; i.e., células no germinales.

Chira: Nombre asignado a la inflorescencia de las musáceas.

Crioconservación: Conservación del germoplasma en estado latente mediante su almacenamiento a muy bajas temperaturas, normalmente sumergido en nitrógeno líquido. Actualmente se aplica para el almacenaje de semillas y polen de plantas, microorganismos, espermatozoides animal, y líneas celulares de cultivo de tejidos. Sinónimos: conservación criobiológica, conservación por congelación.

Cultivar (Abr. cv): Término aceptado internacionalmente para designar una variedad de plantas cultivadas. Debe poder distinguirse de otras variedades de su especie por determinadas características y retener sus caracteres distintivos cuando se reproduce bajo condiciones específicas.

Cultivo en inmersión temporal: Cultivo en medio líquido, el cual permite la inmersión temporal por tiempo y frecuencia definido del material vegetal.

Cultivo en suspensión: Tipo de cultivo en el que células o agrupaciones celulares crecen y se multiplican suspendidas

en un medio líquido.

Curva de crecimiento celular: Cinética de crecimiento de una suspensión celular, constituida de las fases de latencia, exponencial, lineal y estacionaria.

Desarrollo: Suma total de acontecimientos que contribuyen a la formación progresiva de un organismo. Los dos grandes aspectos del desarrollo son el crecimiento y la diferenciación.

Desinfección: Tentativa de eliminación por medios químicos de los microorganismos (especialmente hongos y bacterias) de un cultivo o muestra. Sinónimo: esterilización.

Diferenciación celular: Transición de las células (determinada por la activación y desactivación programada de los correspondientes genes) que pasan de formar parte de un tipo de tejido inespecífico en el que las células hijas tampoco están diferenciadas, a un tipo específico en el que la línea celular se especializa hasta convertirse en un tejido u órgano reconocible.

Embriogénesis somática: Proceso de diferenciación de embriones somáticos tanto de células de explantes (embriogénesis directa), como del callo generado por explantes (embriogénesis indirecta). Sinónimo: embriogénesis asexual.

Embrión somático: Estructura organizada de forma similar a la de un embrión. Aunque morfológicamente es similar a un embrión cigótico, se genera a partir de células vegetales somáticas. Bajo condiciones *in vitro*, los embriones somáticos experimentan procesos de desarrollo similares a los embriones de origen cigótico. Cada embrión somático es potencialmente capaz de desarrollarse en una plántula normal.

Esterilización: Eliminación de microorganismos mediante calor, radiación, filtración o el uso de compuestos químicos.

Explante: Fragmento de una planta que se aísla de la misma y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo.

Extracto de malta: Mezcla de compuestos orgánicos preparados a base de malta. Se utiliza como aditivo en los medios de cultivo.

Friable: De naturaleza disgregable. Se refiere al callo altamente morfogenético, apto para establecer una suspensión celular.

Gameto: Célula madura reproductora capaz de fusionarse con una célula de origen similar pero de sexo opuesto para formar un cigoto que dará origen a un nuevo organismo. Los gametos normalmente tienen una dotación cromosómica haploide. En plantas, son gametos las células generativas del polen, el núcleo espermático y la ovocélula.

Gelrite™: Marca comercial de un polisacárido refinado obtenido a partir de *Pseudomonas* y utilizado como agente gelificante y como sustituto del agar.

Genómica: Estrategia de investigación que, a partir de la caracterización molecular y de la clonación de genomas completos, estudia la estructura, el funcionamiento y los cambios evolutivos del material genético para poder dar respuesta a preguntas biológicas fundamentales.

Genotipo: 1) Constitución genética de un organismo. 2) Constitución alélica de un locus particular, p. ej., Aa o aa. 3) Efecto suma de todos los loci que contribuyen a la expresión de un carácter.

Germoplasma: Individuo, grupo de individuos o clones

representativos de un genotipo, variedad, especie o cultivo, que forma parte de una colección mantenida *in situ* o *ex situ*.

Inducción: Acción o proceso que desencadena algún efecto específico

***in vitro*:** Fuera del organismo o en un medio artificial. Se aplica, por ejemplo, a células, tejidos u órganos cultivados en contenedores de cristal o plástico.

Inflorescencia: Tallo o eje que agrupa muchas flores.

Inositol: Ácido cíclico (hexahidroxiclohexano) que forma parte de algunos fosfoglicéridos celulares. Es una sustancia nutritiva a la que se refiere con frecuencia como "vitamina" en relación con los cultivos de tejidos vegetales.

Lactosa: Disacárido compuesto por una unidad de glucosa y otra de galactosa que se produce en la glándula mamaria y se encuentra en la leche.

Línea celular: Linaje celular que puede mantenerse en un cultivo *in vitro*. Si el cultivo se prolonga durante un período de tiempo largo puede ser objeto de cambios genéticos significativos que determinan que el genotipo de una línea celular no sea el mismo que el de la célula inicial.

Macroelemento: Elemento químico esencial para un crecimiento y desarrollo normales. En medios de cultivo de tejidos, se llaman macronutrientes a los elementos que deben suministrarse en concentraciones superiores a 0.5 mmol/litro. Sinónimo: Macronutriente

Manitas: Dícese de las flores inmaduras de las musáceas.

Medio de cultivo: Cualquier sistema nutritivo preparado para el cultivo de células, bacterias u otros organismos;

generalmente una mezcla compleja de nutrientes orgánicos e inorgánicos.

Medio líquido: Solución líquida de cultivo sin agente solidificante para el crecimiento celular *in vitro*.

Medio sólido: Medio nutritivo solidificado por la adición de un agente gelificante, generalmente agar.

Meristemo: Tejido vegetal específico, pero indiferenciado, en el que las células son capaces de dividirse activamente y diferenciarse en tejidos especializados como raíces y tallos.

Morfogénesis: Estudio experimental de los factores que regulan los procesos ontogenéticos y condicionan la expresión de la forma de la planta.

Muesca: Hendidura del embrión somático ubicada en el extremo terminal del mismo, ésta se forma al final de la fase de regeneración indicando que el embrión ya está listo para pasar a la fase de germinación.

Microelemento: Elemento nutritivo que se requiere en cantidades muy pequeñas.

Musáceas (Musaceae): Familia botánica de plantas que agrupa los bananos y plátanos.

Nodular: Término que se emplea generalmente para describir la textura rugosa de un callo.

Oxidación (oxidación fenólica): Aspecto común que presentan los tejidos vegetales como resultado de una herida. La oxidación fenólica suele manifestarse por un oscurecimiento del tejido y generalmente precede a la inhibición del crecimiento y, en los casos graves, a la necrosis y muerte del tejido.

pH: Medida logarítmica de la acidez/alcalinidad de una solución. Un pH 7 corresponde a una disolución neutra (p. ej., el del agua pura), mientras que por debajo de 7, la solución es ácida, y por encima, alcalina.

Plantas fuera de tipo: Plantas que se alejan del patrón normal de desarrollo conocido para la especie o cultivar. Sinónimo: variante.

Plántula: Pequeño vástago enraizado regenerado de un cultivo celular mediante embriogénesis u organogénesis. Las plántulas pueden desarrollarse en plantas normales cuando se transplantan al suelo.

Ploidía: Número de juegos completos de cromosomas por célula, p. ej., un juego: haploide, dos juegos: diploide, etc.

Proembrión: Grupo de células que provienen de la división de un óvulo fecundado o de un embrión somático antes de que se diferencien aquellas células que darán lugar al embrión.

Pseudotallo: En bananos y plátanos corresponde a la estructura semejante a un tallo formada por las bases envolventes de las hojas (vainas), por cuyo centro crecen los ejes florales.

Regeneración celular: En cultivo de tejidos significa una respuesta morfogénica de un explante a un estímulo que resulta en la formación de órganos, embriones o plantas completas.

Rizoma: Vástago carnoso, casi siempre subterráneo, con catafilas en los nudos; posee yemas axilares y raíces adventicias.

Subcultivo: Subdivisión del material vegetal ya establecido *in vitro*, en medio de cultivo nuevo.

Suspensión celular: Células cultivadas en medio líquido en agitación; la expresión se suele emplear para designar cultivos en suspensión de células y de agregados celulares.

Variante: Se refiere a las plantas obtenidas por modificación genética de naturaleza conocida o no, diferente a una mutación.

Vástago: Sinónimo: pseudotallo en el caso de las musáceas.

Vitroplanta: Planta producida por medio del cultivo *in vitro*.

Volumen de Células Establecidas (SCV): Permite medir la tasa de crecimiento de la suspensión celular, se determina mediante la precipitación de las células por gravedad.

Yema floral: Sinónimo: ápice floral ó chira en las musáceas.

XIII. Lista de abreviaturas y acrónimos

2,4 – D: Acido 2,4 – diclorofenoxiacético.

2-iP: 2-isopenteniladenina.

AIA: Acido indolacético.

ANA: Acido naftalenacético.

BAP: 6-benzilaminopurina.

CATIE: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

CE: Callo embriogénico.

CI: Callo ideal.

CORBANA: Corporación Bananera Nacional.

ES: Embriogénesis somática.

FeEDTA: Quelato de hierro

M1: Medio de cultivo de inducción de la ES.

M2: Medio de cultivo líquido para las SCE.

M3: Medio de regeneración.

M4: Medio de germinación de los embriones.

MS: Medio de cultivo de Murashige y Skoog.

RITA: Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado.

SCE: Suspensiones Celulares Embriogénicas.

SCV: Volumen de Células Establecidas.

XIV. Referencias.

- Aguilar, M.E.; Ortiz, J.L.; Gamboa, K. 2005. Informe técnico final del Proyecto "Desarrollo de cultivares de plátano resistentes a la Sigatoka Negra para América Latina": ejecutado en el marco del Convenio de Cooperación Técnica BID/IICA – FTG/RF-9901-RG. Contraparte CATIE. 15 p. (Sin publicar).
- Aguilar, M.E.; Ortiz, J.L.; Rivas, G. 2002. Final Report, "Optimisation of a new breeding pathways to create banana for local markets", ejecutado en el marco del Convenio de Cooperación Técnica INCO-DC, ERBIC18CT970204. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p:1-15. (Sin publicar).
- Aguilar, M.E.; Ortiz, J.L.; Guzmán, I. 2002. Embriogenéssomática para la propagación masal y el mejoramiento genético de banano y plátano. In Biodiversidad, Biotecnología y Bioseguridad: Un enfoque hacia Mesoamérica y el Caribe. Simposio REDBIO/CATIE, Turrialba, Costa Rica, 3-5 Julio 2002. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p.34.
- Assani, A.; Haicour, R.; Wenzel, G.; Côte, F.; Bakry, F.; Foroughi-Wehr, B.; Ducreux, G.; Aguilar, M.E.; Grapin, A. 2001. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 20(6):482–488.
- Côte, F.; Sandoval, J.A.; Marie, P.; Auboiron, E. 1993. Variations in micropropagated bananas and plantains: literature survey. *Fruits* 48 (1):15-22.
- Côte, F.; Sandoval, J.A.; Marie, P.; Auboiron, E. 1998. Phenotypic Variations in Micropropagated Bananas And Plantains. *CORBANA* 23 (50):177-198.

- Côte, F.; Domergue, R.; Mommarson, S.; Schwendiman, J.; Teisson, C.; Escalant, J.V. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiologia Plantarum* 97:285-290.
- Cronauer-Mitra, S.; Krikorian, A.D. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Reports* 7: 23-25.
- Dhed 'A.D.; Dumortier, F.; Panis, B.; Vuylsteke, D.; de Langhe, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46(2):125-135.
- Dodeman, V.L.; Ducreux, G.; Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*. 48(313):1493-1509.
- Escalant, J.V. ; Teisson, C. 1988. Embryogènèse somatique chez *Musa* sp. *Physiologie Végétale* 306 (3):277-281.
- Escalant, J.V.; Teisson, C.; Côte, F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flower of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp). *In Vitro Cellular and Development Biology* 30:181-186.
- Fisher, D. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16: 92-96.
- Flores, E.M. 1998. La Planta: estructura y función. 2 ed. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 504 p.
- Grapin A.; Schwendiman J.; Teisson C. 1996. Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro Cellular and Development Biology* 32:66-71.
- Grapin, A.; Ortiz, J.L.; Domergue, R.; Babeau, J.; Monmarson, S.; Escalant, J.V.; Teisson, C.; Côte, F. 1998. Establishment

of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flowers of *Musa*. *INFOMUSA* 7(1):13-15.

- Grapin A.; Ortiz J.L.; Lescot T.; Ferrière N.; Côte F. 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 61: 237-244.
- Gray, D. 2000. Nonzygotic embryogenesis. In Trigiano, R.N.; Gray, D.J. eds. *Plant Tissue Culture: concepts and laboratory exercises*. Boca Ratón, Florida. CRC, Press pp. 175 – 189.
- Ma, S.S. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. In *Symposium on Tissue Culture of Horticultural Crops*. (1988, Taipei, Taiwan). Proceedings. Taiwan, National Taiwan University. P.181-188.
- Margara, J. 1987. *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro*. Los meristemas y la organogénesis. Trad. al español por J.M. Mateo; y P. Urbano. Madrid, Ediciones MUNDI-PRENSA. 232 p.
- Novak, F.J.; Afza, R.; Duren, M. van; Perea, D.M.; Conger, B.V.; Tang, X. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology* 7:154-159.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Ortiz, J.L. 2001. Desarrollo de una metodología para la transformación genética de banano (cv. 'Gran enano') y plátano (cv. 'Curraré') de consumo local para introducir

resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Tesis de Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 60p._

Ortiz, J.L.; Gómez-Lim M.; Vásquez, N.; Aguilar, M.E. 2002. Transformación genética de banano (cv. Gran enano) y plátano (cv. Curraré) para introducir resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). In Reunión Internacional ACORBAT (15, 2002, Cartagena, Colombia). Cartagena, ACORBAT. P.49-53.

Reinert, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebekulturen aus karotten. Naturewissenschaften 45:344–345.

Schenk,R.;Hildebrant 1972, A. 1972. Medium and tecniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany 50: 199-204

Sandoval, J.1994. Variations resulting from banana *in vitro* culture (*Musa* AAA, cv. 'Grande naine'). Morphological, cytological and hormonal characterization elements (Ga_s). INFOMUSA 3 (2):31

Sandoval, J; Perez, L.; Cote, F.1997. Estudio Morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. Gran enano). Etapas de cultivo *in vitro*, aclimatación y campo. CORBANA 22 (48): 41-60.

Steward, F.C.; Mapes, M.O.; Mears, K. A. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures growth from freely suspended cells. American Journal of Botany 45:704–708.

Strosse, H.; Domergue, R.; Panis, B.; Escalant, J.V.; Côte, F. 2003. Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano. Montpellier, Francia, 31p. (Guías técnicas INIBAP).

- Vargas, A.; Sandoval, J. 2005. Evaluación agronómica, de producción y de calidad de 'Yangambi km 5' (AAA) y 'Dátil' (AA). *INFOMUSA* 14 (1): 6-10.
- Williams, E.G.; Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. A review article. *Annals of Botany*. 57: 443-462.
- Zaid, A.; Hugues, H.G.; Porceddu, E.; Nichola, F. 2004. *Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación*. Trad. al español por M.J. Fernández; P. Rodríguez; E. Cabrera y A. Afonso. Roma, FAO. 510 p. (Estudio FAO Investigación y Tecnología N° 9.).

Corporación Bananera Nacional (CORBANA)
Dirección de Investigaciones.
Tel.: (506) 2713 1600 • Fax: (506) 2763 3055
Apartado: 390-7210 Guápiles, Costa Rica
www.corbana.co.cr

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
(CATIE)
Sede Central, CATIE 7170
Cartago, Turrialba 30501
Costa Rica
Tel.: (506) 2558-2000 • Fax: (506) 2558-2060
www.catie.ac.cr