

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

*Suspensiones celulares y embriogénesis somática en Musa
acuminata ssp. malaccensis.*

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

Magister Scientiae

por

Claudia Gisela Marroquín Tornöe.

CATIE

Turrialba, Costa Rica

1991


Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

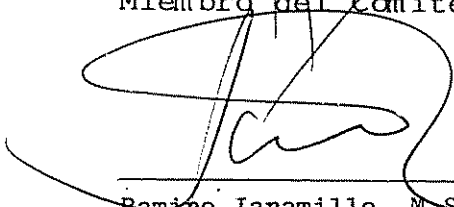
COMITE ASESOR:



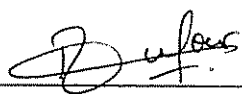
Jean Vincent Escalant, Ph.D.
Profesor Consejero



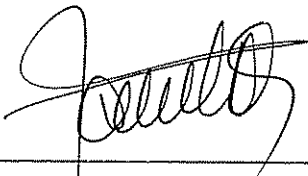
Víctor Villalobos, Ph.D.
Miembro del Comité



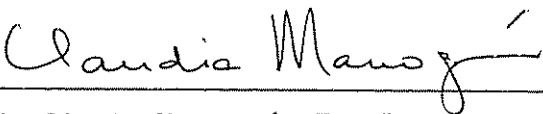
Ramiro Jaramillo, M.Sc.
Miembro del Comité



Magali Dufour, Ph.D.
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios
de Posgrado



Claudia Gisela Marroquín Tornöe
Candidato

A mis padres,

A mis hermanos,

A Li-Piu.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que prestaron su colaboración durante esta investigación.

A mi profesor consejero, Dr. Vincent Escalant, por sus valiosas enseñanzas, estímulo y constante apoyo en la realización de esta investigación.

A la M. Sc. Nelly Vásquez, por su colaboración en el estudio histológico y revelado fotográfico.

A los miembros de mi comité asesor: Dra. Magaly Dufour, Dr. Ramiro Jaramillo y Dr. Victor Villalobos, por sus valiosas sugerencias en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Victor Villalobos, director del Programa I, por su estímulo y apoyo para iniciar mis estudios de maestría.

A todo el personal de la Unidad de Biotecnología del CATIE por su gran cooperación, camaradería y amistad.

A Celina, por su amistad, su apoyo y por ser como es.

CONTENIDO

Página

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	REVISION DE LITERATURA.....	8
2.1.	El género <i>Musa</i>	8
2.1.1.	Morfología.....	11
2.1.2.	Biología floral.....	11
2.1.2.3.	Desarrollo del fruto.....	14
2.2.	La embriogénesis.....	17
2.2.1.	Embriogénesis cigótica.....	18
2.2.1.1.	El cigoto.....	19
2.2.1.2.	Embriogénesis cigótica temprana.....	19
2.2.1.3.	Proembrión globular y diferenciación.....	20
2.2.2.	Embriogénesis cigótica en <i>Musa</i>	21
2.2.3.	Embriogénesis somática.....	21
2.2.3.1.	Tipos de embriogénesis somática.....	23
2.2.3.2.	Origen del embrión somático.....	24
2.2.3.3.	Criterios de identificación de un embrión somático.....	24
2.2.3.4.	Antecedentes de embriogénesis somática en <i>Musa</i>	25

3.	MATERIALES Y METODOS.....	27
3.1.	Material vegetal.....	27
3.1.1.	Preparación del material y aislamiento de los embriones cigóticos.....	28
3.2.	Estudio del desarrollo <i>in vivo</i> del embrión cigótico de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i>	29
3.3.	Embriogénesis somática en medio sólido.....	29
3.3.1.	Iniciación de callos.....	30
3.3.2.	Medios de cultivo.....	30
3.3.3.	Condiciones de cultivo.....	33
3.4.	Establecimiento de suspensiones celulares.....	33
3.4.1.	Iniciación del callo embriogénico.....	34
3.4.2.	Medios de cultivo.....	34
3.4.3.	Condiciones de cultivo.....	36
3.4.4.	Callos en suspensión.....	36
3.4.5.	Iniciación de las suspensiones celulares.....	39
3.4.6.	Regeneración de plantas.....	40
3.4.7.	Cultivo de las suspensiones en medio sólido.....	41
3.4.8.	Estudio histológico.....	42
3.4.7.1.	Microscopía de luz.....	42

	3.4.7.2. Microscopía electrónica de rastreo.....	43
4.	RESULTADOS.....	45
	4.1. Desarrollo <i>in vivo</i> del embrión cigótico de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i>	45
	4.1.1. Morfología externa de las semillas.....	45
	4.1.2. Estudio histológico del embrión cigótico de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i>	45
	4.2. Embriogénesis somática en medio sólido	49
	4.2.1. Condiciones de cultivo.....	50
	4.2.2. Formación de embriones somáticos.....	52
	4.2.3. Germinación de embriones somáticos....	53
	4.3. Establecimiento de suspensiones celulares.....	59
	4.3.1. Iniciación de callos embriogénicos....	59
	4.3.2. Callos en suspensión.....	60
	4.3.3. Iniciación y comportamiento de las suspensiones celulares.....	61
	4.3.4. Germinación de los embriones producidos en las suspensiones celulares.....	68
	4.3.5. Cultivo del filtrado de las suspensiones.....	74
	4.4. Estudio histológico del callo embriogénico....	76

4.4.1.	Microscopía de luz.....	76
4.4.2.	Microscopía electrónica de rastreo....	78
5.	DISCUSION.....	82
5.1.	Desarrollo <i>in vivo</i> del embrión cigótico de <i>M. acuminata ssp. malaccensis</i>	82
5.2.	Embriogénesis somática en medio sólido.....	84
5.2.1.	Formación de embriones somáticos.....	85
5.2.2.	Germinación de los embriones somáticos.....	88
5.3.	Iniciación de callos embriogénicos para el establecimiento de suspensiones celulares....	89
5.3.1.	Callos en suspensión.....	90
5.3.2.	Comportamiento de las suspensiones celulares.....	91
5.4.	Germinación de los embriones producidos en suspensiones celulares.....	94
5.5.	Cultivo del filtrado de las suspensiones.....	95
6.	CONCLUSIONES.....	97
7.	RECOMENDACIONES.....	99
8.	LITERATURA CITADA.....	101
9.	ANEXOS.....	108

MARROQUIN T., C.G., 1991. Suspensiones celulares y embriogénesis somática en *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 102 p.

Palabras claves: *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*, embriogénesis somática, suspensiones celulares, mejoramiento genético.

RESUMEN

Se realizaron estudios en embriogénesis somática a partir de callos y suspensiones celulares utilizando embriones cigóticos inmaduros de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*.

Se hizo un estudio preliminar de la embriogénesis cigótica *in vivo* con el objeto de determinar histológicamente el estadio de desarrollo de los embriones utilizados en esta investigación, y además comparar los estadios de desarrollo de la embriogénesis cigótica con la embriogénesis somática.

Se produjo la formación de callos embriogénicos utilizando un medio semi-sólido con 2 mg.l^{-1} de picloram, tanto en condiciones de luz como en condiciones de completa oscuridad. La formación de embriones somáticos a partir de los callos se logró en un medio semisólido con la concentración de picloram reducida a $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Se probaron diferentes medios de cultivo para la germinación de los embriones somáticos. Los porcentajes de germinación estuvieron entre 20-36%.

Se establecieron suspensiones celulares cultivando callos de diferentes edades en medio líquido. Se observó un

mejor crecimiento celular y la formación de embriones somáticos en las suspensiones iniciadas con callos entre 7-15 semanas de edad. Preparaciones frescas al microscopio de las suspensiones mostraron la presencia de numerosas células embriogénicas en división.

Los embriones somáticos producidos en las suspensiones celulares fueron separados por filtración e inóculados en un medio de germinación. Los porcentajes de regeneración de plantas a partir de estos embriones oscilaron entre 12.5-22.6%. Alícuotas de 0,5 ml de filtrado fueron utilizadas para hacer un plaqueo en un medio basal y en un medio de germinación. Después de 30 días se observó la formación de numerosos embriones somáticos, principalmente en el plaqueo realizado con las suspensiones iniciadas con callos entre 7-13 semanas de edad.

El estudio histológico de los callos mostró que los callos muy jóvenes presentan una estructura muy compacta. Durante las siguientes semanas la estructura del callo se vuelve más friable, lo que explica la facilidad con la que estos callos formaron mejores suspensiones celulares. Los callos de más de 21 semanas se vuelven nuevamente muy compactos y diferenciados.

Los cortes histológicos de los embriones somáticos maduros mostraron una estructura bipolar con la presencia de polos radicales, gémula y bandas procambiales.

Aunque los porcentajes de regeneración de plantas en esta investigación son bajos, resultan mayores que los obtenidos en otras investigaciones en *Musa*: 1.5-12% (Novak, *et al.*, 1989) y 10-14% (Dhed'a *et al.*, 1991). La utilización de reguladores químicos como ABA y hexositoles, o mecanismos de separación física como filtración, permitirían una mejor sincronización en el proceso de diferenciación de los embriones somáticos. Esto permitiría obtener mayores porcentajes de germinación.

Por primera vez en esta especie, se logró la regeneración de plantas completas a partir de suspensiones celulares por la vía de embriogénesis somática. La simplicidad de esta técnica abre una nueva perspectiva para el mejoramiento genético de los diploides de *Musa*. Las suspensiones celulares son un material valioso para investigar sobre la obtención y fusión de protoplastos, selección *in vitro* de variantes y técnicas de ingeniería genética. Esto permite realizar estudios sobre transformación genética utilizando diferentes métodos de transformación directa e indirecta.

MARROQUIN T., C.G. 1991. Cell suspensions and somatic embryogenesis in *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Master of Science Thesis. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 102 p.

Key words: *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*, somatic embryogenesis, cell suspensions, genetic improvement.

SUMMARY

Cell suspensions of the subspecies *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* were established by culturing embryogenic calli, initiated from immature zygotic embryos, in liquid medium.

A preliminary study on the zygotic embryogenesis in *in vivo* conditions was done, in order to determine histologically the immature state of the zygotic embryos used in this study. Also, to provide information on the pattern of development of the zygotic embryo.

Embryogenic calli were obtained by culturing immature zygotic embryos (45 days old) on a semi-solid medium containing 2 mg.lt⁻¹ of picloram. Formation of somatic embryos was induced by transferring the calli to a medium in which picloram was reduced to 0,5 mg.lt⁻¹. Different mediums were tested for the germination of the somatic embryos. Germination frequencies of 20-36% were attained.

Cell suspensions were established by culturing calli at different ages of culture in liquid medium. The growth of the cell suspension cultures was followed by measuring the total cell mass as packed cell volume. Using this technique it was

possible to verify that cell growth occurred only in those cell suspensions initiated with calli 7-13 weeks old. A microscopic control of these cell suspensions showed many cells with embryogenic characteristics and numerous cell divisions. The formation of somatic embryos was evident about 8 to 12 weeks after the suspensions were initiated.

The somatic embryos were isolated by sieving (100 μ m) and then transferred to a germination medium. The germination percentages for these embryos averaged 19%. Aliquots of 0,5 ml of the cell suspensions were plated in basal (MS) and germination mediums. After 30 days of culture, the formation of numerous somatic embryos was observed in the plating done with the cell suspensions initiated with calli 7-15 weeks old.

Histological sections showed that the initial compact and globular callus was a stage of further maturation of the zygotic embryo. Analysis of the subsequent steps of explant growth showed that callus between 7-15 weeks revealed large intercellular spaces, thus explaining its friability. Callus aged more than 21 weeks became again too compact and more differentiated.

Histology of the differentiated somatic embryos showed a bipolar structure with the shoot and root poles connected to a reserve parenchyma with trifid vascularization, and surrounded by an epidermis.

Even though the germination percentages of the somatic embryos into plantlets in this experiment is low (12-22%), it is higher than those obtained in other works with *Musa*: 1,5-12% (Novak *et al.*, 1989) and 10-14% (Dhed'a *et al.*, 1991). The use of growth regulators as ABA and osmoregulators as mannitol in the differentiation media, would allow a better synchronization of the differentiation process, thus resulting in higher germination frequencies.

For the first time with this species, cell suspensions resulting in plant regeneration via somatic embryogenesis were obtained. The simplicity of this technique allows a better utilization of biotechnologies in genetic improvement of *Musa* diploid species, essential for banana and plantain breeding. It also provides an excellent material for genetic transformation studies.

LISTA DE CUADROS

En el texto:	Página
Cuadro 1. Medios de cultivo empleados para la germinación <i>in vitro</i> de embriones somáticos.....	32
Cuadro 2. Medios de cultivo utilizados para la iniciación de los callos embriogénicos.....	35
Cuadro 3. Medios de cultivo empleados para el establecimiento de las suspensiones celulares.....	38
Cuadro 4. Porcentajes de formación de callo a partir de embriones cigóticos de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> en condiciones de luz y oscuridad en cuatro repeticiones.....	50
Cuadro 5. Prueba T para los tratamientos luz y oscuridad para la formación de callo.....	51
Cuadro 6. Porcentajes de germinación <i>in vitro</i> de embriones somáticos de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> en tres medios de cultivo.....	53
Cuadro 7. Promedio semanal de aumento de volumen celular ($\mu\text{l/ml}$) y aumento neto de volumen celular después de 12 semanas de cultivo en las suspensiones iniciadas con callos de 3 a 21 semanas de edad.....	62
Cuadro 8. Porcentajes de germinación, formación de callo y oxidación a partir de embriones somáticos producidos en la suspensión 7.....	69
Cuadro 9. Porcentajes de germinación, formación de callo y oxidación a partir de embriones somáticos producidos en la suspensión 12.....	70
Cuadro 10. Porcentajes de germinación, formación de callo y oxidación a partir de embriones somáticos producidos en la suspensión 13.....	70
Cuadro 11. ANDEVA para las variables porcentaje de germinación y porcentaje de formación de callo a partir de embriones somáticos producidos en las suspensiones 7, 12 y 13.....	71

Cuadro 12. Número total de embriones somáticos formados por alicuotas de 0,5 ml de suspensión en dos medios de cultivo y tres repeticiones.....74

LISTA DE FIGURAS

En el texto:	Página
Figura 1. Ilustración esquemática de una planta de <i>Musa</i>	12
Figura 2. Corte esquemático de un embrión cigótico de <i>Musa</i>	16
Figura 3. Corte histológico de un embrión cigótico de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> de 40 días (165x).....	48
Figura 4. Corte histológico de un embrión cigótico de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> de 50 días (165x).....	48
Figura 5. Corte histológico de un embrión cigótico de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> de 60 días (165x).....	48
Figura 6. Corte histológico de un embrión cigótico de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> de 70 días (165x).....	48
Figura 7. Corte histológico de un embrión cigótico de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> de 120 días (33x).....	48
Figura 8. Callo formado a partir de un embrión cigótico después de 8 semanas de cultivo (6x).....	55
Figura 9. Callo embriogénico mostrando embriones somáticos en distintos estados de desarrollo (5x).....	55
Figura 10. Callo friable con embriones somáticos en la superficie (5x).....	55
Figura 11. Callo compacto después de 20 semanas de cultivo (5x).....	55
Figura 12. Porcentaje de formación de callo a partir de embriones cigóticos de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> en condiciones de luz y oscuridad.....	56

Figura 13. Corte longitudinal de un embrión somático de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> (33x).....	57
Figura 14. Corte longitudinal de un embrión somático de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> (33x).....	57
Figura 15. Corte longitudinal de un embrión somático de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> (33x).....	57
Figura 16. Corte longitudinal de un embrión somático de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> (33x).....	57
Figura 17. Embrión somático germinado mostrando brotes múltiples (4x).....	58
Figura 18. Embrión somático germinado mostrando un solo brote (4x).....	58
Figura 19. Plántula proveniente de un embrión somático en medio basal (1x).....	58
Figura 20. Plántulas provenientes de embriones somáticos en fase de aclimatación en invernadero.....	58
Figura 21. Regresión entre volumen celular y tiempo de las suspensiones 5 y 7.....	63
Figura 22. Regresión entre volumen celular y tiempo de las suspensiones 9 y 11.....	63
Figura 23. Regresión entre volumen celular y tiempo de las suspensiones 12 y 13.....	64
Figura 24. Regresión entre volumen celular y tiempo de las suspensiones 4 y 18.....	64
Figura 25. Vista general de células en suspensión (82,5x).....	67
Figura 26a,b, y c. Células embriogénicas en distintos estados de división (190x); d (165x).....	67
Figura 27a. Porcentaje de germinación de los embriones somáticos producidos en las suspensiones 7,12 y 13.....	72
Figura 27b. Porcentaje de formación de callo a partir de los embriones somáticos producidos en las suspensiones 7,12 y 13.....	72

Figura 27c. Porcentaje de oxidación de los embriones somáticos producidos en las suspensiones 7,12 y 13.....	73
Figura 28. Grupo de embriones somáticos germinando (10x).....	75
Figura 29. Embrion somático germinando (10x).....	75
Figura 30. Embriones somáticos formados 30 días después del cultivo del filtrado de las suspensiones (0,5x).....	75
Figura 31. Embriones somáticos formados en el cultivo del filtrado de las suspensiones (18x).....	75
Figura 32. Corte histológico mostrando división celular en la periferia de la región haustorial del embrión cigótico (370x).....	79
Figura 33. Corte histológico mostrando el inicio de la formación de callo en la zona perivascular del haustorio del embrión cigótico (370x).....	79
Figura 34. Corte histológico de zona meristemática con mucha división celular (370x).....	79
Figura 35. Corte histológico de callo compacto (185x).....	79
Figura 36. Corte histológico mostrando estructuras proembrionarias (370x).....	79
Figura 37. Corte histológico mostrando callo formado a partir de los tejidos perivasculares del embrión cigótico (185x).....	79
Figura 38. Corte histológico mostrando callo después de 9 semanas de sembrado (43x).....	80
Figura 39. Corte histológico mostrando conjunto de embriones somáticos (33x).....	80
Figura 40. Corte histológico mostrando embriones somáticos (33x).....	80
Figura 41. Corte histológico mostrando aspecto general de un callo friable (165x).....	80

Figura 42. Corte histológico de callo de 25 semanas mostrando traqueidas (185x).....	80
Figura 43. Micrografías de microscopía electrónica de rastreo a. proembrión; b. conjunto de embriones mostrando embriogénesis somática adventicia; c. embrión adventicio; d. embrión somático; e. gémula emergiendo del embrión somático.....	81

LISTA DE ANEXOS

En el texto:	Página
Anexo 1A. Formulación de las sales de Murashige y Skoog (1962).....	108
Anexo 2A. Formulación de las vitaminas de Murashige y Skoog (1962).....	109
Anexo 3A. Formulación de las vitaminas de Morel (1948).....	109
Anexo 4A. Preparación de cortes histológicos.....	110
Anexo 5A. Lista de Abreviaturas.....	114

1. INTRODUCCION

El banano y el plátano son una fuente importante de alimento para millones de personas en las regiones tropicales del mundo. La producción total mundial se estima en 64 millones de toneladas anuales, de las cuales 26 millones son producidas en América Latina y el Caribe (INIBAP, 1989).

El valor promedio anual de las exportaciones de banano de América Latina y el Caribe se estima en más de mil millones de dólares y la producción de plátano en más de 600 millones. A diferencia del cultivo del banano, la producción de plátano involucra principalmente la agricultura de subsistencia. Sólo en Centro América y el Caribe aproximadamente 40,000 pequeños agricultores se dedican a esta actividad (INIBAP, 1989).

Desde sus inicios, el cultivo del banano ha encontrado serios problemas fitosanitarios. Debido al mal de Panamá, (*Fusarium oxysporum* var. *cubense*) se discontinuó el uso del cultivar "Gros Michel", por ser altamente susceptible al citado hongo. La resistencia y la exitosa adaptación del grupo "Cavendish" proporcionó un excelente sustituto para enfrentar este problema; sin embargo, la aparición de la

raza IV de *Fusarium* en Australia, Islas Canarias, Filipinas, Taiwan y Africa del Sur afectó también a los tipos Cavendish y representa desde su aparición, una nueva amenaza para este cultivo (Rowe y Richardson, 1975).

Los clones del grupo Cavendish son muy susceptibles a nemátodos y manchas foliares. *Radopholus similis* ha reemplazado a *Fusarium* como el patógeno de suelo más importante y la denominada "Sigatoka Negra" o "Raya Negra" (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) se ha convertido en la principal amenaza para el cultivo en la región. Se han hecho muchos esfuerzos para combatir estos patógenos principalmente con el uso de agroquímicos. Sin embargo, su aplicación resulta costosa y con serios daños sobre el medio ambiente, por lo que se ha considerado que el mejoramiento genético es probablemente la respuesta más apropiada y definitiva a estos patógenos (Stover y Buddenhagen, 1986).

A nivel mundial existen varios programas de mejoramiento genético en *Musa*, destacando los de Brazil, Honduras, Guadalupe y Jamaica en América Latina y el Caribe, y el del IITA en Nigeria. Los programas Brasileño y Hondureño usan la fertilidad residual femenina de algunos triploides que hibridizan con diploides sintéticos mejorados, para la creación de tetraploides. Por otro lado, el programa francés

utiliza diploides mejorados cuyo genoma doblan con colchicina para crear individuos tetraploides. En ambos casos, los tetraploides se cruzan con diploides mejorados para la obtención de triploides. También en tetraploides se pueden encontrar plantas comercializables. La F.H.I.A. (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola) ha producido algunos tetraploides AAAB tipo "French" que actualmente están en proceso de evaluación tanto en América como en África.

Es claro que los diploides juegan un papel importante en el mejoramiento genético de *Musa*. Los diploides utilizados en programas de mejoramiento, han sido básicamente miembros de *M. acuminata*. Según Shepherd *et al.* (1986) esta especie contiene una variabilidad muy amplia. En los aspectos morfológicos, existen variaciones en el porte, el número y desarrollo de hijos, el número de manos por racimo y el tamaño de los frutos. En cuanto a enfermedades, se han localizado fuentes de resistencia a las tres razas del "Mal de Panamá", a la "Sigatoka amarilla" (*Mycosphaerella musicola*), a la "Sigatoka negra" (*M. fijiensis*) y al nemátodo barrenador (*Radopholus similis*).

Entre las subespecies más utilizadas en los programas de mejoramiento de banano y plátano se encuentran *M. acuminata* ssp. *malaccensis*, que presenta una resistencia a *Fusarium* y a

M. musicola, y una tolerancia a *M. fijiensis*; y *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* que presenta alta resistencia a la "Sigatoka Negra" (Rowe, 1985; Rowe y Richardson, 1985).

Las técnicas de cultivo *in vitro* proporcionan una vía complementaria a los programas convencionales de mejoramiento en *Musa*. Esto es principalmente importante por el hecho de que las variedades comestibles son triploides, partenocárpicas y estériles; la condición partenocárpica se traduce en baja variabilidad genética y la esterilidad dificulta las posibilidades de mejoramiento por hibridación.

Las nuevas estrategias de mejoramiento se basan en métodos de cultivo *in vitro* como producción de plantas haploides, variantes somaclonales, suspensiones celulares y fusión de protoplastos, asociados con técnicas tradicionales de hibridación con diploides o aplicadas directamente (Escalant y Teisson, 1989). También las técnicas de transformación genética presentan un tremendo potencial para el mejoramiento genético de Musas (Murfett y Clarke, 1987).

Para la mayoría de las técnicas de cultivo *in vitro* así como para las técnicas de ingeniería genética, la embriogénesis somática es de mucha utilidad. Estas dependen en gran parte de una vía de regeneración de plantas completas

a partir de células somáticas o protoplastos, que la embriogénesis somática provee (Dhed´a et al., 1991). Otra aplicación importante de la embriogénesis somática involucra una fase intermediaria de callo, la cual puede ser una importante fuente de variación. Estas variaciones se han observado en callos en cultivo prolongado y se asocian con cambios genéticos como mutaciones, aneuploidía, poliploidía etc. (Bajaj, 1989). Además, el establecimiento de suspensiones celulares puede ser una fuente de variación y permitir, bajo presión de selección o mutagénesis, la manipulación genética (transferencia de genes) con la posterior regeneración de plantas.

La inducción de embriogénesis somática fué descrita por primera vez en *Daucus carota* por Reinert (1958) y Steward et al., (1958). Desde entonces la formación de embriones somáticos ha sido descrita en más de 100 especies (Ammirato, 1987; Conger, 1981). Desafortunadamente muchas de las especies agrónomicamente importantes, como son las monocotiledoneas, no pueden regenerar plantas completas con la misma facilidad de los modelos biológicos como la zanahoria y el tabaco.

En *Musa*, algunos autores han reportado la obtención de embriones somáticos a partir de tejidos vegetativos (Cronauer

y Krikorian, 1983; Bakry y Rossignol, 1985; Jarret *et al.*, 1985; Banerjee *et al.*, 1987; Krikorian, 1987; Novak *et al.*, 1989; Sannasgala, 1989) y de partes florales (Srinivasa Rao *et al.*, 1982; Bakry *et al.*, 1985). Sin embargo, en muchos de estos trabajos sólo se ha logrado rizogénesis y no se han publicado estudios histológicos que confirmen la diferenciación de embriones somáticos. También se ha publicado la obtención embriogénesis somática a partir de callos utilizando embriones cigóticos inmaduros. Estos estudios reportan una embriogénesis típica complementada con estudios histológicos y la regeneración de plantas completas (Escalant y Teisson, 1989; Cronauer y Krikorian, 1988).

Las suspensiones celulares en *Musa* han sido poco estudiadas. Escalant *et al.*, (1989) obtuvieron la formación de embriones en suspensiones a partir de callos de embriones cigóticos inmaduros en diploides. Novak *et al.*, (1989) comunicaron la obtención de embriones somáticos y regeneración de plantas a partir de suspensiones iniciadas con callos de tejidos de hoja y rizoma en algunos diploides y triploides. Recientemente Dhed'á *et al.*, (1991) obtuvieron regeneración de plantas en suspensiones celulares de un triploide (ABB) con una regeneración a planta completa entre 10-14%.

El presente trabajo persiguió el establecimiento de suspensiones celulares utilizando callos embriogénicos de diferentes edades de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* y pretendió estudiar el efecto de la edad del callo sobre el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas. El estudio propuso los siguientes objetivos:

- Establecer suspensiones celulares embriogénicas a partir de callos.
- Determinar las mejores condiciones para el establecimiento de las suspensiones celulares.
- Realizar estudios histológicos a fin de determinar los eventos anatómicos más importantes en la embriogénesis somática.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 El género *Musa*

Los bananos y plátanos pertenecen al género *Musa*, de la familia Musaceae. Este género se divide en cuatro secciones de las cuales la sección *Eumusa* incluye los bananos y plátanos comestibles así como sus parientes silvestres (De Langhe, 1969).

Es una hierba gigante y perenne, monocotiledonea cuyo tallo verdadero es el cormo. Elseudotallo (eje aéreo) está formado por vainas foliares que rodean el ápice del tallo que se encuentra localizado en la base delseudotallo (Sannasgala, 1989). El número cromosómico básico de *Musa* es $n=11$ y el nivel de ploidía varía según la especie. La mayoría de los bananos y plátanos son híbridos interespecíficos de las dos especies silvestres *M. acuminata* (genoma AA) y *M. balbisiana* (genoma BB).

La especie *M. acuminata* contiene mayor variabilidad genética y abarca cerca de seis subespecies, algunas todavía no bien definidas y cada una con su propia distribución en Asia y aún en Oceanía (Shepherd *et al.*, 1986):

M. acuminata ssp. malaccensis,

ssp. burmannicoides,

ssp. burmannica,

ssp. banskii,

ssp. microcarpa,

ssp. siamea.

En *M. balbisiana* se reconocen varios tipos importantes:

M. balbisiana tipo Cameroun.

tipo Honduras,

tipo Tani,

tipo Lat Velchi.

Los híbridos interespecíficos se agrupan de acuerdo a la contribución de cada una de las especies silvestres a la ploidia. Dependiendo de la combinación de genomas encontramos tipos diploides, triploides y tetraploides. En la naturaleza se han identificado los grupos AA, AB, BB, AAA, AAB y ABBB (Stover y Simmonds, 1987). Estos incluyen entre 300-500 genotipos.

El desarrollo de bananos comestibles inicialmente fue el resultado de la selección del diploide *M. acuminata* que incluye variedades partenocárpicas. Los cultivares AA dieron lugar a la formación de triploides AAA a través de restitución cromosómica durante la meiosis. La mayoría de

los bananos de exportación pertenecen a este grupo (INIBAP, 1989).

Un paso importante en la evolución del banano fue el cruce natural entre *M. acuminata* y *M. balbisiana* que produjo híbridos diploides, triploides y tetraploides. Esto extendió el rango de sus características y contribuyó a difundir su cultivo de las tierras húmedas bajas del trópico a tierras altas y estaciones más secas (INIBAP, 1989). Actualmente los cultivares más importantes se clasifican en tres grupos:

El grupo AAA contiene los cultivares de los subgrupos "Cavendish" (Poyo, Grande Naine), "Gros Michel" y "Figue Rose". El grupo AAB contiene los plátanos (tipo falso cuerno, tipo francés) y "Figue Pomme". El grupo ABB contiene los cultivares "Pelipita", "Saba" y "Bluggoe" (Escalant, 1987).

El desarrollo de nuevos cultivares probablemente dependa del uso de una base genética más amplia de germoplasma diploide de *M. acuminata* y *M. balbisiana*, así como de la selección dentro de los híbridos existentes y del uso de otras especies silvestres como material inicial (*Shepherd et al.*, 1986).

2.1.1. Morfología

Los banáños y plátanos son plantas herbáceas conseudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales o "hijos" (Fig. 1). Las hojas tienen una distribución helicoidal (filotaxia espiral) y las bases foliares circundan el tallo o cormo, dando origen alseudotallo. La inflorescencia es terminal y crece através del centro delseudotallo hasta alcanzar el follaje superior y salir (Soto, 1985). Cadaseudotallo produce solo una inflorescencia y luego muere; la planta continua su ciclo de vida a través de la formación de "hijuelos laterales". De esta manera la planta puede propagarse vegetativamente por tiempo aparentemente indefinido (De Langhe, 1969).

2.1.2. Biología floral

La transición de la fase vegetativa a la fase floral sucede con una elongación gradual hacia arriba del ápice localizado en el centro del cormo (Sandoval, 1989). Esto marca el comienzo del crecimiento del tallo verdadero que después de haber permanecido mucho tiempo a ras del suelo, va a convertirse en aéreo, creciendo de antemano en el centro delseudotallo. Durante este periodo los brotes florales se

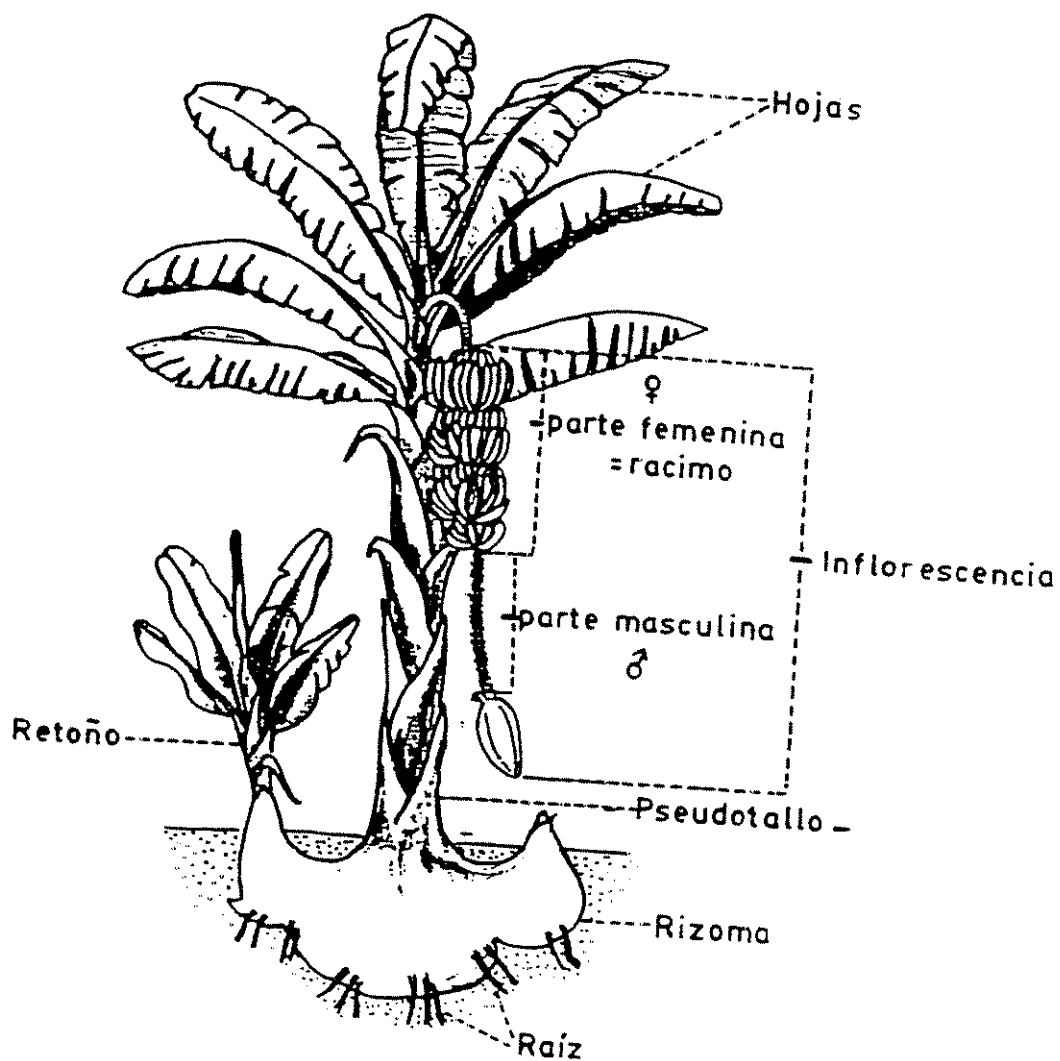


Figura 1. Ilustración esquemática de una planta de *Musa*.

irán diferenciando sin cesar y comenzarán su desarrollo mientras que, simultáneamente, el tallo con la inflorescencia terminal, se alarga para abrirse en medio de las últimas hojas (Champion, 1968).

La inflorescencia consiste en un eje en continuo crecimiento, en el que las flores se encuentran arregladas en grupos nodales (manos) dispuestas en dos hileras, cada una recubierta por una bráctea (De Langhe, 1969). Se producen entre 12-20 flores por nudo. Los primeros 5-15 nudos o manos, producen flores femeninas; los nudos distales producen flores masculinas (estaminadas) y en los nudos intermedios pueden haber flores de estructura transicional o neutra (Purseglove, 1972).

La tasa de crecimiento de la inflorescencia suele ser regular; casi diariamente una mano madura y se expone. Seguidamente, en un lapso de dos semanas después de la emergencia de la inflorescencia de la última vaina foliar, todas las flores femeninas se expanden y han sido polinizadas. Después de unos días, la parte masculina de la inflorescencia empieza a florecer. En los tipos silvestres el polen de una planta en floración puede mantenerse viable por cerca de tres meses (De Langhe, 1969).

La flor es fuertemente zigomórfica. El perianto está dividido en dos partes: un conjunto de cinco pétalos unidos (perigonio) en posición abaxial, y un tépalo libre en posición adaxial. El androceo está constituido por cinco estambres. El ovario infero es trilocular, pluriovular y de placentación axial (Escalant, 1987).

Las flores femeninas y masculinas difieren en varios aspectos. Las primeras son más grandes y poseen un ovario bien desarrollado que excede al perianto en longitud; poseen un estilo grande y los estambres se encuentran reducidos a estaminodios. En las flores masculinas, el ovario es abortivo, el estilo y el estigma son reducidos y las anteras bien desarrolladas aunque en los cultivares comestibles raramente contienen polen (Stover y Simmonds, 1987).

2.1.2.1. Desarrollo del fruto

En las especies silvestres seminíferas, la polinización es esencial para el desarrollo del fruto. El fruto maduro contiene una masa de semillas negras y duras rodeadas de una pulpa escasa y dulce que se desarrolla de las paredes del ovario y de la septa. En contraste, los cultivares comestibles son partenocárpicos; es decir, desarrollan una masa de pulpa comestible sin que se presente polinización

(Simmonds, 1962). El óvulo es fecundado en las 24 horas siguientes a la floración. El cigoto se divide en los siguientes quince días. El crecimiento del embrión es lento y la diferenciación comienza aproximadamente después de 55 días. El meristemo apical y caulinar aparecen generalmente a los dos meses (Escalant, 1987). En la semilla madura, el embrión presenta la forma de "hongo" característico de las Musáceas (Fig. 2). La porción agrandada, "cabeza", se denomina haustorio y es la parte principal del cotiledón. La porción angosta, "pie", del embrión representa el eje epicotilo-hipocotilo-radicula, así como una parte del cotiledón. Esta porción se encuentra dentro del collar del micrópilo (McGahan, 1961).

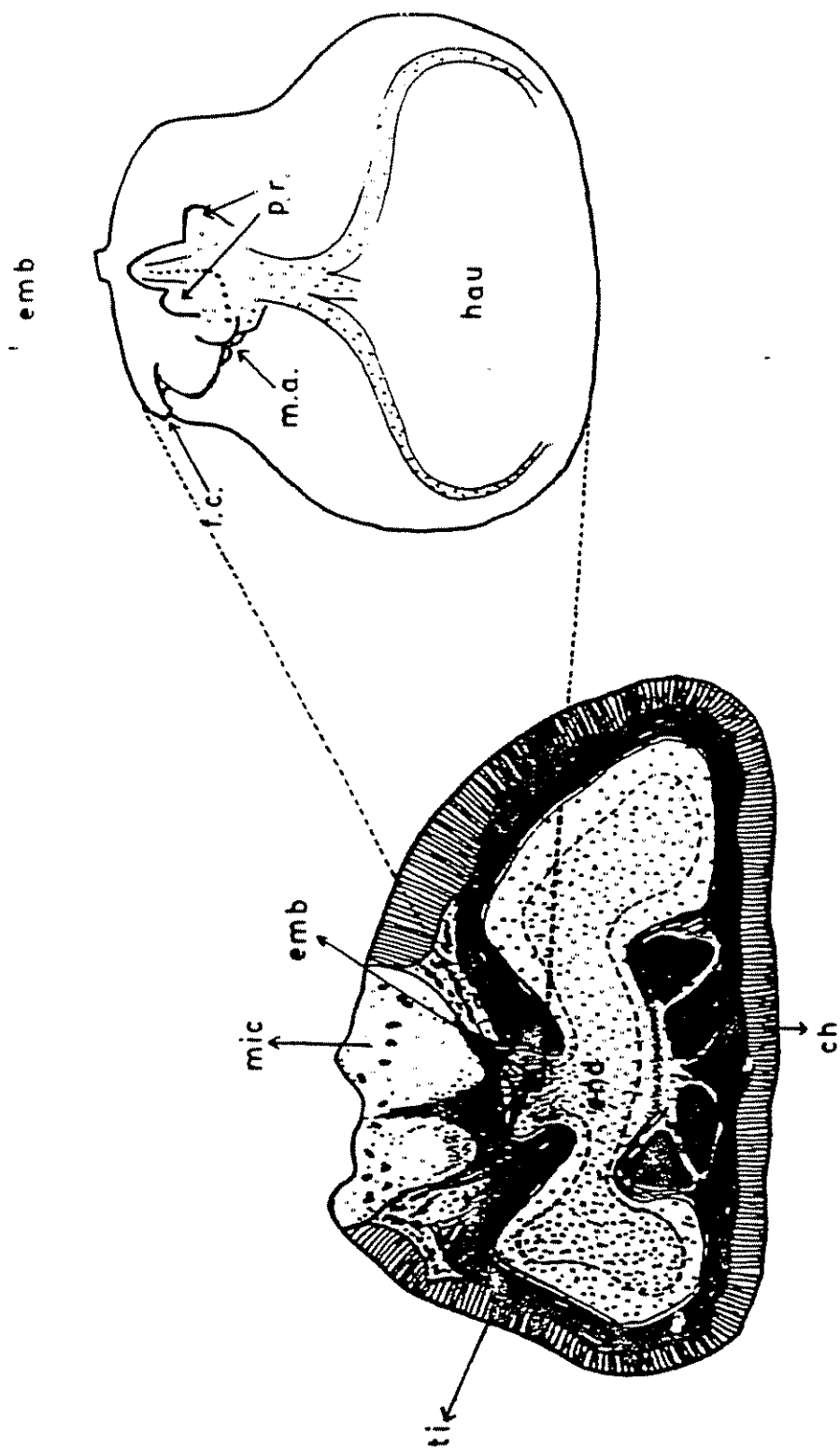


Figura 2. Corte esquemático de una semilla y embrión de *Musa* (Bouharmont, 1963; McGahan, 1961). ch=chalaza; emb=embrión; mic=micrópilo; ti=tegumento interno; fc=filisura cotiledonaria; hau=haustorio; ma=meristema apical; pr=polos radiculares.

2.2 La embriogénesis

En la reproducción sexual, los gametos se fusionan para formar una sola célula o cigoto que se desarrolla en una nueva planta a través de un embrión. La formación de un embrión se conoce como embriogénesis y cuando es a partir de un cigoto se conoce como embriogénesis cigótica. De este, resulta una planta que posee características de ambos padres (Esau, 1977).

La embriogénesis somática consiste en el desarrollo de una o varias células hasta la formación de un embrión. La diferencia principal con la embriogénesis cigótica es que las células que dan origen al embrión somático no resultan de la fecundación sexual.

La embriogénesis somática se ha reportado más en dicotiledoneas que en monocotiledoneas (Evans *et al.*, 1981). También se han hecho más estudios sobre el patrón de desarrollo de los embriones cigóticos en dicotiledoneas (Sannasgala, 1989).

En el inicio de los estudios embriogénicos prevalecía el concepto de que monocotiledoneas y dicotiledoneas tenían patrones individuales en el desarrollo del embrión cigótico.

Esto ya no es válido puesto que durante la embriogénesis cigótica los estadios cuadrante, octante y proembrión globular muestran un linaje y configuración celular similar en mono y dicotiledoneas. En el momento de diferenciación en el proembrión globular es cuando surgen diferencias fundamentales. La organización del ápice caulinar embriogénico sigue patrones morfogenéticos muy diferentes en mono y dicotiledoneas (Natesh y Rau, 1984). A partir del estado globular el desarrollo del embrión cigótico en dicotiledoneas continúa a los estadios de corazón y torpedo. Esta situación difiere en las monocotiledoneas donde los estadios generales de la embriogénesis de dicotiledoneas no están presentes (Sannasgala, 1989).

2.2.1. Embriogénesis cigótica

La embriogénesis cigótica en las plantas se inicia con la fertilización de la célula femenina (oosfera) por el gameto masculino (polen). Inicialmente el cigoto no muestra diferenciación evidente, pero luego se establece la polaridad y se desarrolla en un embrión organizado a través de una secuencia de eventos característicos para cada especie en particular (Johri y Rao, 1984).

2.2.1.1. El cigoto

El cigoto es una estructura unicelular que a través de una secuencia programada de eventos da lugar a un embrión multicelular con órganos bien diferenciados, y que como tal, contiene las diversas funciones de una planta adulta. En angiospermas se encuentra localizado en el polo micropilar del saco embrionario con su porción basal adherida a la pared del saco embrionario, mientras la porción apical se proyecta hacia la célula central (Natesh y Rau, 1984).

Uno de los aspectos más importantes del cigoto es su apariencia polarizada. El núcleo y la mayoría del citoplasma se reúnen en el extremo de la chalaza, mientras una vacuola ocupa el extremo micropilar. Por esto en el momento de la mitosis las dos células hijas reciben diferentes elementos citoplasmáticos lo que determina que tengan diferentes comportamientos (Natesh y Rau, 1984).

2.2.1.2. Embriogénesis cigótica temprana

En la mayoría de las angiospermas el cigoto se divide transversalmente resultando en dos células superpuestas, la célula apical y la célula basal. En algunos casos esta división genera células de diferente tamaño (Natesh y Rau,

1984). La división de cada una de las dos células del proembrión resulta en un tétrada de cuatro células arreglada de acuerdo a un patrón específico. El estado de tétrada es seguido por otra división vertical. Estas cuatro células yuxtapuestas constituyen el estado de cuadrante que a través de otra división origina un octante. El cuadrante y el octante son de importancia como progenitores del locus cotiledonario y epicotiledonario del ápice caulinar (Natesh y Rau, 1984).

2.2.1.3. Proembrión globular y diferenciación

Las numerosas divisiones celulares que continúan con el desarrollo del proembrión después del estado de octante hacen que el proembrión asuma una configuración globular. Las células más externas del proembrión se organizan en una capa llamada protodermis. Este es el inicio de la diferenciación y el momento en que surgen las diferencias fundamentales entre mono y dicotiledoneas (Sannasgala, 1989).

La diferenciación del protoderma en el proembrión globular es seguida por el establecimiento de un locus cotiledonar y epicotiledonar en el ápice caulinar; la radícula junto con la región hipocotiledonar son distinguibles en el polo radicular. La región

hipocotiledonar contiene tejidos vasculares con parénquima. En la familia *Musaceae* la región hipocotiledonar también contiene los laticíferos característicos de esta familia (Sannasgala, 1989).

2.2.2. Embriogénesis cigótica en *Musa*

Los estudios en embriogénesis cigótica en *Musa* han sido pocos. Bouharmont (1963) estudió el desarrollo del óvulo fecundado en *M. acuminata* subsp. *burmannica*; McGahan (1961) hizo un estudio sobre la semilla y embrión en *M. balbisiana*.

También existen estudios en otras familias del orden Zingiberales que incluyen los generos *Costus*, *Heliconia*, *Strelitzia*, *Dioscorea*, *Allium* etc. (Sannasgala, 1989).

2.2.3. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática puede ocurrir en la naturaleza o puede ser inducida artificialmente en condiciones *in vitro* (Sannasgala, 1989). El primer caso se ha observado en especies de *Citrus*, *Mangifera*, *Eugenia* etc. a partir de tejidos reproductivos como la nucela y células sinérgidas, y en tejidos vegetativos como márgenes de hoja en *Malaxis paludosa* (Raghavan, 1976).

Los embriones somáticos fueron observados por primera vez por Steward *et al.* (1958) en cultivos en suspensión de zanahoria y en cultivos de callo en medio sólido por Reinert (1958).

La embriogénesis somática se ha reportado más en especies dicotiledoneas que en monocotiledoneas, puesto que estas últimas han mostrado más dificultades para su cultivo *in vitro*. Sin embargo se han reportado estudios de embriogénesis somática y regeneración de plántulas en muchos cereales, otras gramíneas y algunas palmas (Evans *et al.*, 1981).

En la mayoría de las especies, la obtención de embriones somáticos en cultivo *in vitro* está muy influenciada por el explante utilizado así como por las condiciones de cultivo. Para que pueda suceder la activación de los genes embriogénicos, el explante debe estar poco diferenciado y poco polarizado. La activación del programa genético embrionario se obtiene generalmente utilizando medios con sustancias reguladoras que actúan como auxinas fuertes como 2,4-D y picloram.

2.2.3.1. Tipos de embriogénesis somática

Algunos autores indican que existen dos patrones de desarrollo de la embriogénesis somática: directa e indirecta. De acuerdo a esto, en la embriogénesis somática directa las células ya se encuentran en un estado fisiológico apropiado para un desarrollo embriogénico requiriendo de las condiciones apropiadas para iniciar la división celular y expresar embriogénesis. Incluyen células de tejidos reproductivos como nucela, células sinérgidas e hipocótilo, así como células somáticas de diferentes tejidos y órganos.

Por el contrario la embriogénesis somática indirecta, requiere de una fase intermediaria de callo. El callo es un conjunto de diferentes tipos de células no organizadas que conservan la capacidad de dividirse. Una vez originado el callo, hay proliferación y desarrollo de un tejido embriogénico. Para ello se requiere de reguladores de crecimiento tanto para iniciar la división celular como para que se presente la activación de genes embrionarios para que el tejido alcance la competencia embriogénica (Sannasgala, 1989).

2.2.3.2. Origen del embrión somático

El origen uni y multicelular de los embriones somáticos es una interrogante que surge con frecuencia. Se ha ilustrado el desarrollo directo de embriones a partir de una sola célula (Steward, 1958) pero también se han reportado muchos casos en que los embriones se forman a partir de agregados de células que semejan células meristemáticas. Hacias (1978), sugiere que aunque un embrión somático provenga de un grupo de células en división, este complejo de células se forma a partir de una sola célula que se divide. Sin embargo, lo anteriormente expuesto también sugiere un origen unicelular del embrión.

2.2.3.3. Criterios de identificación de un embrión somático

Las observaciones morfológicas para la identificación de embriones somáticos no son suficiente evidencia para confirmar la identidad de los mismos. Según Sannasgala (1989) y Escalant y Teisson (1989) el embrión somático presenta las siguientes características:

- tiene autonomía frente al tejido generador (generalmente por medio de una epidermis).
- es una estructura bipolar con un ápice radicular, apical y cotiledones.
- presenta bandas procambiales entre los dos ápices.

Para utilizar estos criterios es necesario realizar estudios histológicos que los apoyen.

2.2.3.4. Antecedentes de embriogénesis somática en *Musa*

Varios investigadores han publicado trabajos sobre la obtención de embriones somáticos en *Musa*. A continuación se señalan las investigaciones más importantes:

Cronauer y Krikorian (1983) utilizando ápices cultivados *in vitro* de triploides en medio líquido, obtuvieron "masas de células proembriónicas" y embriones somáticos. Sin embargo, no se obtuvo formación de plantas completas ni se reportó un análisis histológico de los embriones somáticos. Bakry y Rossignol (1985) lograron la formación de callos a partir de varios tipos de explantes de triploides. En este caso tampoco se reportó la regeneración de plantas.

En trabajos posteriores se logró la obtención de embriones somáticos y regeneración de plántulas a partir de callos obtenidos de embriones cigóticos inmaduros (Cronauer y Krikorian, 1988; Escalant y Teisson, 1989).

Las publicaciones sobre suspensiones celulares en *Musa* han sido pocas. Moham Ram y Steward (1964) reportaron por primera vez la obtención de suspensiones celulares utilizando callos obtenidos a partir de frutos inmaduros. Por otro lado, Cronauer y Krikorian (1986) obtuvieron cultivos a partir de células en empalizada las cuales fueron aisladas empleando enzimas en segmentos de hojas. Sin embargo, en estos dos casos, las suspensiones obtenidas no fueron embriogénicas.

Novak *et al.*, (1989) produjeron suspensiones embriogénicas con callos formados a partir de tejido de rizoma en cultivares diploides y triploides. Más recientemente se publicó la obtención de suspensiones celulares y regeneración de plantas a través de embriogénesis somática, a partir de yemas neoformadas del cultivar triploide 'Bluggoe' (Dhed'a *et al.*, 1991).

3. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza-CATIE, Turrialba, Costa Rica, durante noviembre de 1990 a septiembre de 1991.

3.1. Material vegetal

El material vegetal para todos los experimentos consistió en embriones cigóticos inmaduros obtenidos a partir de semillas del diploide *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* (AA), procedentes de la colección de musáceas del CATIE.

Se utilizaron embriones cigóticos inmaduros para inducir la formación de callos embriogénicos. En pruebas preliminares (datos no publicados) se determinó que los embriones en estado inmaduro (45-60 días) muestran una mayor capacidad para la formación de callo por lo que se seleccionó este estadio.

Considerando que la fertilización se presenta inmediatamente después de la emergencia de las flores, se estimó que la edad de los embriones era similar al número de

días transcurridos después de la polinización. Empíricamente se ha empleado el número de brácteas de la parte masculina del raquis que se han levantado, como un indicador proporcional con respecto al número de días transcurridos a partir de la polinización. Sin embargo solo mediante un estudio histológico se puede determinar con más precisión la verdadera edad del embrión (De Langhe, 1969).

3.1.1. Preparación del material y aislamiento de los embriones cigóticos

Se colectaron frutos inmaduros de *M. acuminata* ssp. *malaccensis*. Estos fueron lavados con cepillo y jabón bajo agua corriente y luego sumergidos en alcohol al 70% (v/v) durante tres minutos (Escalant y Teisson, 1989). Se observó que una segunda desinfección con hipoclorito de sodio no es necesaria siempre que el fruto se encuentre cerrado, sano y sin heridas.

En condiciones asépticas el material se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Cuidadosamente se eliminó la cáscara del fruto y se procedió al aislamiento de los embriones con ayuda de un microscopio estereoscópico. Debido al tamaño de los embriones inmaduros se requirió aislar el embrión con una porción del tegumento interno (Figura 3).

3.2. Estudio del desarrollo *in vivo* del embrión cigótico de *M. acuminata ssp. malaccensis*

Con el propósito de observar los distintos estados de desarrollo del embrión cigótico en las condiciones de campo de CATIE, se hizo un estudio histológico de su desarrollo.

Se recolectaron frutos de 40,50,56,60,70 y 120 días de *M. acuminata ssp. malaccensis* en la colección de musáceas de CATIE. Las semillas fueron extraídas, fijadas en FAA y preparadas para microscopía de luz con parafina y resina siguiendo el protocolo de la sección 3.4.7.1. Las semillas fueron seccionadas a través del polo micropilar.

3.3. Embriogénesis somática en medio sólido

El proceso se inició con la inducción de callos embriogénicos. Seguidamente se probaron dos medios de cultivo para inducir la formación de embriones somáticos a partir de los callos. Una vez obtenidos los embriones se experimentó con distintos medios de germinación para la germinación y desarrollo de plantas completas.

3.3.1. Iniciación de callos

Se utilizaron embriones de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* provenientes de frutos de 50 días. Los frutos fueron desinfectados, y los embriones aislados e inóculados en el medio para embriogénesis somática.

3.3.2. Medios de cultivo

Se sembraron 100 embriones en el medio de cultivo para la iniciación de callo descrito por Escalant y Teisson (1989), consistiendo en sales de Murashige y Skoog (1962) con los macroelementos diluidos a la mitad, vitaminas de Morel (1950), sacarosa (60 g.l^{-1}), KH_2PO_4 (200 mg.l^{-1}), picloram (2 mg.l^{-1}), gelrite (2 g.l^{-1}) y ajustando el pH a 5,8 previo a la esterilización en autoclave.

Una vez inducida la formación de callos (2-3 meses) estos fueron transferidos a un segundo medio consistente en un medio MS completo, reduciéndose la concentración de picloram de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ y sacarosa a 30 g.l^{-1} . También se utilizó un medio con 2 mg.l^{-1} de picloram como control.

Para la germinación de los embriones somáticos se experimentó con tres medios de cultivo: medio MS basal, un

medio MS suplementado con BA y AIA y un medio MS suplementado con 2ip y AIA (Cuadro 1). Se sembraron 50 embriones somáticos en cada medio, provenientes de 20 callos diferentes. Los medios se dispensaron en tubos de ensayo de 15 x 2,5 cm en un volumen de 10 ml por tubo.

Cuadro 1. Medios empleados para la germinación *in vitro* de embriones somáticos.

Medio 1	Medio 2	Medio 3
Sales MS	Sales MS	Sales MS
Vitaminas MS	Vitaminas MS	Vitaminas MS
Sacarosa (30 g.l ⁻¹)	Sacarosa (30 g.l ⁻¹)	Sacarosa (30 g.l ⁻¹)
BA (0,5 mg.l ⁻¹)	Zip (2 mg.l ⁻¹)	
AIA (2 mg.l ⁻¹)	AIA (2 mg.l ⁻¹)	
Gelrite (2 g.l ⁻¹)	Gelrite (2 g.l ⁻¹)	Gelrite (2 g.l ⁻¹)
pH 5,8	pH 5,8	pH 5,8

3.3.3. Condiciones de cultivo

Durante la iniciación de callo se trabajó con dos condiciones lumínicas. Un tratamiento consistió en iniciar los callos en completa oscuridad y el otro en condiciones lumínicas con 16 h diarias de luz, con una intensidad lumínica de 10 W.m^{-2} . La producción de embriones somáticos y su germinación se realizaron en condiciones de luz con un fotoperíodo de 16 h. Todos los cultivos se mantuvieron a $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4. Establecimiento de suspensiones celulares

Se realizó utilizando callos embriogénicos. Los callos fueron transferidos semanalmente a medio líquido con el objeto de establecer suspensiones iniciadas con callos de diferentes edades.

Se determinó el crecimiento de las células en suspensión haciendo mediciones periódicas del volumen celular. Las suspensiones en las que se formaron embriones fueron filtradas y los embriones somáticos sembrados en medio de germinación. Las plantas obtenidas fueron transferidas a un medio basal MS.

3.4.1. Iniciación de callo embriogénico

Los callos embriogénicos se iniciaron a partir de embriones cigóticos de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* de 56 días, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.1.1.

3.4.2. Medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo para inducir la formación de callos (Cuadro 2). El medio A fué el descrito por Escalant y Teisson (1989). El medio B o medio de Ma (Universidad Nacional de Taiwan), ha sido utilizado para inducir embriogénesis a partir de flores masculinas (Teisson, comunicación personal).

Los medios se dispensaron en tubos de ensayo de 15x2,5 cm en un volumen de 10 ml por tubo. Se inoculó un embrión por tubo.

Cuadro 2. Medios utilizados para la iniciación de callos embriogénicos

Medio A	Medio B
Macro MS 1/2	Macro MS
Micro MS	Micro MS
FeEDTA	FeEDTA
Vitaminas Morel	Vitaminas MS
KH_2PO_4 (200 mg.l ⁻¹)	Biotina (1 mg.l ⁻¹)
Picloram (2 mg.l ⁻¹)	AIA (1 mg.l ⁻¹)
Sacarosa (60 g.l ⁻¹)	2,4-D (4mg.l ⁻¹)
Gelrite (2 g.l ⁻¹)	ANA (1 mg.l ⁻¹)
	Sacarosa (30 g.l ⁻¹)
	Agarosa (7 g.l ⁻¹)
pH 5,8	pH 5,7

3.4.3. Condiciones de cultivo

Los callos se colocaron en dos condiciones lumínicas diferentes: luz con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad lumínica de 10 W.m^{-2} , y condiciones de completa oscuridad. Ambos a una temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se trabajó con cuatro tratamientos para inducir la formación de callo a partir de embriones cigóticos inmaduros: Medio A + luz, medio A + oscuridad, medio B + luz y medio B + oscuridad. Se realizaron cuatro repeticiones dentro de cada tratamiento y se sembraron 25 embriones por cada repetición. Los porcentajes de formación de callo para cada repetición, se calcularon tomando el número de embriones que formaron callo sobre el número total de embriones en la repetición. Se realizó una prueba T de Student para detectar diferencias entre los tratamientos.

3.4.4. Callos en suspensión

Se iniciaron cultivos de callos en suspensión cada semana desde el momento en que se observó visualmente el inicio de la formación de callo en los explantes. Se utilizaron dos medios de cultivo líquido A y B (Cuadro 3), y

se inició una suspensión semanal con callos provenientes de cada uno de los tratamientos anteriores (sección 3.4.3.).

Los callos en suspensión se establecieron en frascos Erlenmeyers de 50 ml conteniendo 15 ml de medio. Luego se colocaron en agitadores a una velocidad de 80 rpm, en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 h y con la intensidad lumínica y temperatura antes referidas.

Cuadro 3. Medios empleados para el establecimiento de las suspensiones celulares.

Medio A	Medio B
Sales MS	Sales MS
Vitaminas Morel	Vitaminas MS
Picloram (2 mg.l ⁻¹)	Biotina (1 mg.l ⁻¹)
Sacarosa (30 g.l ⁻¹)	Glutamina (100 mg.l ⁻¹)
	Ext. Malta (100 mg.l ⁻¹)
	2,4-D (1 mg.l ⁻¹)
	Sacarosa (45 mg.l ⁻¹)
pH 5,8	pH 5,3

3.4.5. Iniciación de las suspensiones celulares

Las suspensiones formadas a partir de los callos en suspensión, se filtraron utilizando filtros de malla metálica de 500 μm .

Los filtrados constituyeron las suspensiones celulares con las que se trabajó. Los callos (residuo) fueron recuperados y transferidos a frascos Erlenmeyers de 125 ml para la iniciación de nuevas suspensiones utilizando el mismo protocolo de manutención mencionado anteriormente.

El crecimiento de las suspensiones se determinó utilizando el método del PCV ("Packed Cell Volume") que consiste en medir el volúmen celular (Reinert y Yeoman, 1982; Henshaw *et al.*, 1966; Torrey *et al.*, 1961). Este se obtuvo transfiriendo las suspensiones a tubos de centrifuga en condiciones asépticas. Los tubos fueron centrifugados a una velocidad de 2500 rpm durante 3 minutos y el volúmen del precipitado sobre el volúmen total fue medido para calcular la concentración de la suspensión en $\mu\text{l/ml}$. Esta medida fue tomada semanalmente para cada suspensión para luego establecer las correspondientes curvas de crecimiento. Se hicieron regresiones entre el volumen celular y el tiempo para cada suspensión, con el propósito de calcular el cambio

en el volumen celular ($\mu\text{l}/\text{ml}$) por unidad de tiempo. Se probaron varios modelos de regresión, a fin de determinar el que mejor explicaba el comportamiento de cada suspensión.

El medio de las suspensiones fue cambiado cada 15 días utilizando el mismo medio en el que fueron iniciadas.

3.4.6. Regeneración de plantas

Los embriones somáticos producidos en las suspensiones celulares fueron separados por filtración ($100\ \mu\text{m}$) y luego transferidos a cajas petri de $15 \times 150\ \text{mm}$ con el medio de germinación con BA y AIA (Cuadro 1). Luego se colocaron en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h, con la intensidad luminica y temperatura antes referidas.

Se tomaron datos sobre los porcentajes de germinación, formación de callo y oxidación. Estos datos se calcularon tomando el número de embriones que germinaron, formaron callo y se oxidaron, sobre el número total de embriones en cada repetición. Se realizó un análisis de varianza para detectar diferencias para estas variables, entre las suspensiones.

Los embriones que germinaron fueron nuevamente transferidos a un medio basal MS para la obtención de plantas completas.

3.4.7. Cultivo de las suspensiones en medio sólido

Las suspensiones fueron filtradas utilizando filtros de malla metálica de 100 μm . Se tomaron alicuotas de 0,5 ml del filtrado de cada suspensión y se cultivaron en cajas petri de 15 x 60 mm utilizando una pipeta estéril. Se trabajó con dos medios de cultivo: un medio MS basal y un medio de germinación con AIA y BA (Cuadro 1). Se cultivaron 3 repeticiones de cada suspensión para los dos medios de cultivo.

Luego las cajas petri fueron colocadas en las condiciones de luz y temperatura antes descritas.

3.4.8. Estudio histológico

3.4.8.1. Microscopía de luz

Se tomaron muestras cada semana durante tres meses de los tratamientos durante el desarrollo de los callos. Estas muestras se fijaron en FAA durante 48 horas. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas progresivamente en una serie ascendente de etanol e infiltradas con parafina Paraplast Plus. Se prepararon muestras en resina, fijadas en glutaraldehído al 2,5%, deshidratadas y luego infiltradas en historesina Reichert-Jung (Anexo 4A).

Una vez infiltrados los callos en parafina se hicieron cortes a un grosor de 9 micras en un micrótomo manual de rotación. Las muestras infiltradas en resina fueron cortadas a un grosor de 2,5 micras en un ultramicrotomo Sorvall MT1 para resina en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica. Los cortes en parafina fueron teñidos con la coloración cuadruple: safranina, violeta cristal, verde rápido FCF y "orange" G (CIRAD, 1989). Los cortes en resina fueron teñidos con azul de toluidina (Anexo 4A).

Se tomaron muestras frescas de las suspensiones celulares con el propósito de determinar el tipo de células existentes en las suspensiones, así como detectar algunos estadios de la embriogénesis. Las muestras fueron tomadas en condiciones asépticas utilizando una pipete estéril y luego teñidas con azul de toluidina o "cotton blue" (Anexo 4A).

3.4.8.2. Microscopía electrónica de rastreo

Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% durante 24 horas. Luego se hicieron tres lavados (10 min c/u) con buffer de fosfatos. Seguidamente se hizo una post-fijación con tetraóxido de osmio en buffer de fosfatos durante 3 horas. Nuevamente se hicieron tres lavados con buffer de fosfatos.

Luego las muestras fueron deshidratadas en una serie ascendente de alcohol. Una vez deshidratadas fueron sometidas al método de secado por punto crítico y montadas en bases de aluminio utilizando una cinta doble adhesiva y pintura conductora de plata. Estas muestras fueron cubiertas con oro en un cobertor iónico durante cuatro minutos, bajo una corriente de aceleración de 8 M.A., y fueron observadas en un microscopio electrónico de rastreo Hitachi S-570 (hasta

20 Kv) de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

4. RESULTADOS

4.1. Desarrollo *in vivo* del embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis*

4.1.1. Morfología externa de las semillas

Las semillas de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* tienen un tamaño promedio entre 2,5-5,0 mm en diámetro, aunque en un mismo fruto el tamaño de las semillas puede variar. Tienen forma globosa y frecuentemente son aplanadas en los polos del micrópilo y la chalaza.

El color y la dureza de la semilla varía con la edad del fruto. Las semillas de 40 días son blancas y blandas. A los 50 días el color de las semillas cambia un poco tornándose más amarillo. A los 60 y 70 días son más duras y de color café claro. Después de 120 días la semilla ya es muy dura y de color negro.

4.1.2. Estudio histológico del embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis*

El embrión se localiza en el extremo micropilar de la semilla debajo del "casquete nucelar" (Bouharmont, 1963).

En el punto donde se adhiere el embrión a la epidermis nucelar las células son alargadas y empalizadas.

En las secciones histológicas de semillas de 40 días se pudo observar el proembrión como una masa pluricelular pequeña ca. de 94 μm de largo y 35 μm de ancho, no diferenciada y alargada, con la parte superior adherida a la epidermis del nucelo (Fig. 3).

El crecimiento del embrión fue lento puesto que a los 50 días, éste continuó siendo una masa celular pequeña y no diferenciada (ca. de 76 μm de largo y 54 μm de ancho). Se pudo observar un extremo que emerge de la invaginación de la epidermis nucelar y el otro extremo más redondeado (Fig. 4).

A los 60 días el embrión se tornó más asimétrico y cobró la forma de copa descrita por Bouharmont (1963) en embriones de 55 días. En este estadio el embrión tenía un tamaño aproximado de 96 μm de ancho y 109 μm de largo (Fig. 5).

A los 70 días se observó un embrión más diferenciado y orientado, pero aún sin definirse una estructura bipolar. El tamaño alcanzado por el embrión en este estadio fue de 176 μm de ancho y 259 μm de largo (Fig. 6).

En embriones de 120 días fue posible observar un estadio muy desarrollado que ha alcanzado la simetría bipolar. Se pudo observar la presencia de la gémula y meristemas radiculares, así como de células con alto contenido de sustancias de reserva en la región haustorial (Fig. 7).

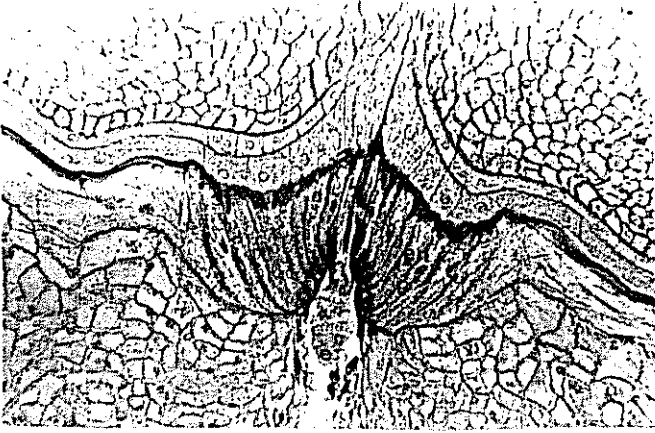
Figura 3. Corte histológico de un embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* de 40 días; e=embrión; en=endospermo (165x).

Figura 4. Corte histológico de un embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* de 50 días; e=embrión; en=endospermo (165x).

Figura 5. Corte histológico de un embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* de 60 días; e=embrión (165x).

Figura 6. Corte histológico de un embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* de 70 días; e=embrión; en=endospermo (165x).

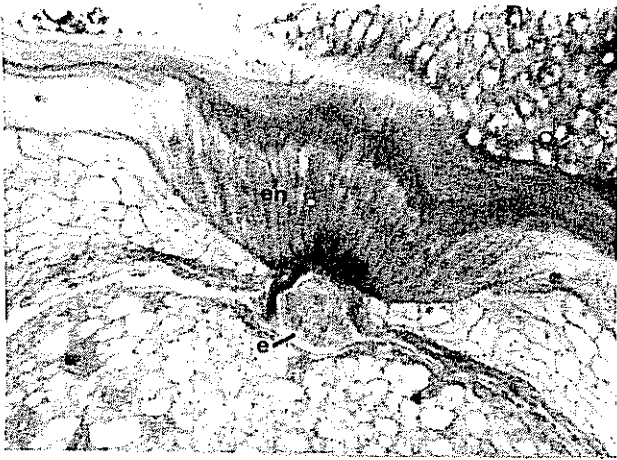
Figura 7. Corte histológico de un embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* de 120 días; g=gémula (33x).



3



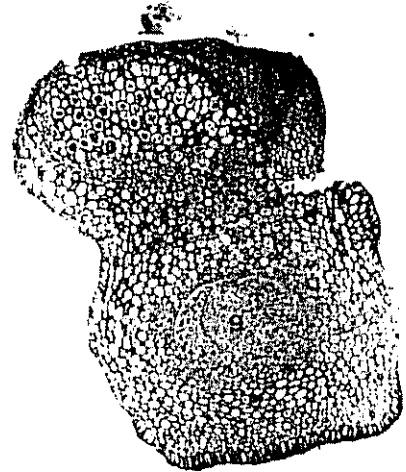
6



4



5



7

4.2. Embriogénesis somática en medio sólido

Las primeras evidencias de formación de callo fueron visibles después de cuatro semanas de sembrados los embriones cigóticos en el medio con picloram. Se observó una diferencia en el tiempo de respuesta entre los embriones, pero después de ocho semanas de sembrados, 68% de los embriones ya habían formado callo.

Esta formación de callo se hizo evidente primero como una pequeña masa blanquecina y globular que se prolongó debajo del tegumento interno (porción de tejido con el cual se aisló el embrión originalmente). Días después, el embrión cobró la forma de "hongo" característica de las Musáceas (McGahan, 1961), donde podía diferenciarse claramente la región haustorial y el eje epicótilo-hipocótilo-radicula (Fig. 8).

En las siguientes 4-8 semanas se hicieron visibles los primeros embriones somáticos en forma de estructuras globulares, alargadas y blancas que aparecen en la superficie del callo (Fig. 9). En esta fase de la embriogénesis el callo es aún pequeño e incospicuo.

4.2.1. Condiciones de cultivo

Se observaron diferencias en el porcentaje de formación de callo entre los embriones cultivados en completa oscuridad y los cultivados en fotoperíodo de 16 h.

El cuadro 4 presenta el porcentaje de formación de callo para cada tratamiento en cuatro repeticiones.

Cuadro 4. Porcentajes de formación de callo en embriones cigóticos de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* en condiciones de luz y oscuridad en cuatro repeticiones.

No. Rep.	LUZ		OSCURIDAD	
	No. embriones sembrados	% embriones formaron callo	No. embriones sembrados	% embriones formaron callo
1	25	80	25	68
2	25	65	25	52
3	25	68	25	66
4	25	81	25	68
Promedio (\bar{x})		73.5	63.5	

En todas las repeticiones el porcentaje de formación de callo fue mayor en condiciones de fotoperíodo que en oscuridad. En presencia de luz se obtuvo un máximo de formación de callo de 81%, y en condiciones de oscuridad un máximo de 68% (Fig. 12). El tamaño del callo y la formación de estructuras embrionarias sobre el mismo fue muy similar en ambas condiciones. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos luz y oscuridad como lo indicó la prueba T (Cuadro 5). Sin embargo, se observaron diferencias en la coloración de los callos sembrados en luz y los sembrados en completa oscuridad. En los callos formados en presencia de luz, con frecuencia se observó coloraciones variadas que iban desde blanquecinas hasta amarillas y verde-amarillas. En los callos que se formaron en oscuridad la coloración siempre fue blanquecina tendiendo a café conforme avanzaba la edad del callo.

Cuadro 5. Prueba T para los tratamientos luz y oscuridad para la formación de callo.

TRAT	N	MEDIA	DESV. EST.	VARIANZAS	T	PR>F
L	4	73.53	8.41	IGUALES	1.72	0.14
O	4	63.51	8.04	DESIGUALES	1.72	0.14

Ho= Varianzas iguales, F= 1.09

Prob>F= 0.9434

4.2.2. Formación de embriones somáticos

Se indujo la formación de embriones somáticos en callos de tres y cuatro meses que fueron transferidos al medio donde se redujo la concentración de picloram a $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ y sacarosa a 30 g.l^{-1} . Después de 4-5 semanas se observaron múltiples estructuras globulares en racimos y solos. En un mismo callo fue posible observar estructuras embrionarias en distintas etapas de diferenciación (Figs. 10 y 43).

Fue posible observar la "fisura cotiledonaria" mencionada por McGahan (1961) como característica de los embriones cigóticos de *Musa balbisiana*. Esta invaginación o fisura semeja a la descrita por Escalant y Teisson (1989) en embriones somáticos de *M. acuminata* y *M. balbisiana*, y a la observada por Dheda et al., (1991) en los embriones somáticos de un triploide (ABB) (Figs. 15 y 43a).

La histología de los embriones somáticos formados mostró una gran similitud con los embriones cigóticos. Fue posible observar la región haustorial, las bandas procambiales y meristemas apical y radicales (Figs. 13,14,15 y 16).

4.2.3. Germinación de los embriones somáticos

La germinación de los embriones somáticos formados en el medio mencionado anteriormente se logró experimentando con tres medios de cultivo diferentes.

Se observó germinación de los embriones en los tres medios empleados, sin embargo hubo una mayor respuesta de germinación en el medio conteniendo BA y AIA (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de germinación de embriones somáticos de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* en tres medios diferentes.

Medio de cultivo	No. emb. sembrados	No. emb. germin.	% embriones germinados
Medio 1 (Basal)	50	13	26%
Medio 2 (AIA + BA)	50	18	36%
Medio 3 (AIA + 2ip)	50	10	20%

Antes de iniciarse la germinación se hizo visible un cambio de color en los embriones que se tornaron amarillos y más tarde verde-amarillos. También se observaron diferencias en el proceso de germinación entre los medios de cultivo. Se encontraron dos tipos de germinación según el medio. Después de tres semanas de cultivo se observó la formación de múltiples brotes en los embriones sembrados en el medio 2

(Fig. 17). En los otros medios el proceso de germinación fue un poco más lento y se manifestó por el desarrollo de la gémula en una planta única mostrando algunas veces brotes adventicios, pero el número de brotes formados fué menor (Fig. 18). El porcentaje más bajo de germinación se observó en el medio basal (Cuadro 6).

Durante la germinación se observó primero la emergencia de la plúmula y seguidamente la aparición de raíces adventicias. Después de cinco semanas se pudo observar brotes verdes y bien formados con dos, tres o más raíces adventicias.

Los embriones germinados que formaron brotes fueron transferidos a un medio MS basal para la obtención de plantas completas (Fig. 19). Las plantas obtenidas fueron transplantadas a bolsas plásticas con tierra estéril y colocadas en el invernadero para su aclimatación (Fig. 20). Actualmente estas plantas se encuentran sembradas en el campo para su evaluación.

Figura 8. Callo formado a partir de un embrión cigótico después de 8 semanas de cultivo (6x).

Figura 9. Callo embriogénico mostrando embriones somáticos (e) en distintos estados de desarrollo (5x).

Figura 10. Callo friable con embriones somáticos en la superficie (5x).

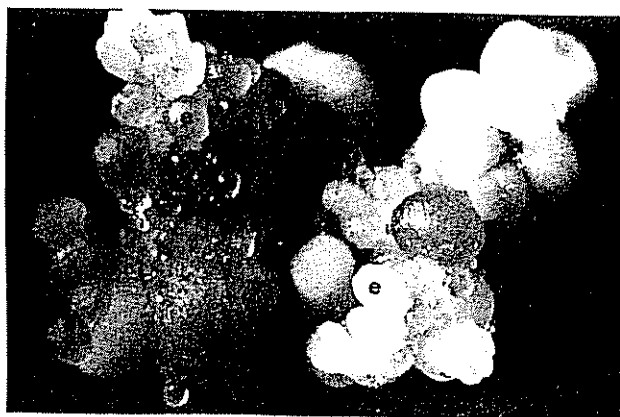
Figura 11. Callo compacto después de 20 semanas de cultivo (5x).



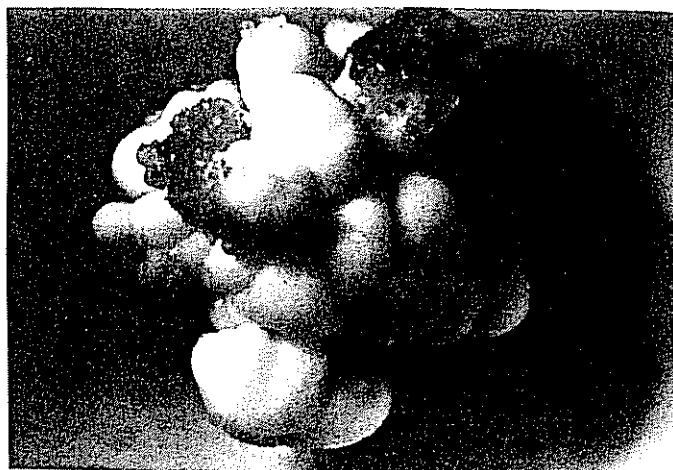
8



9



10



11

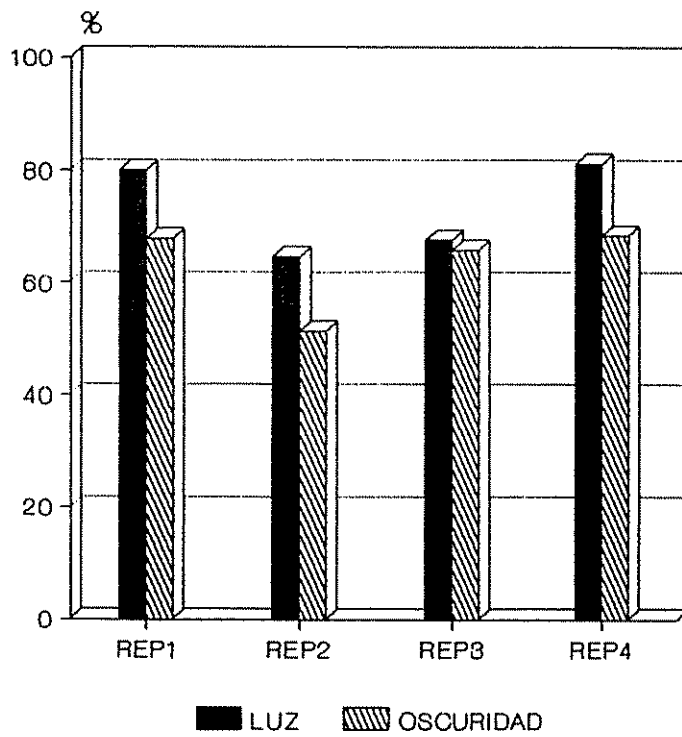


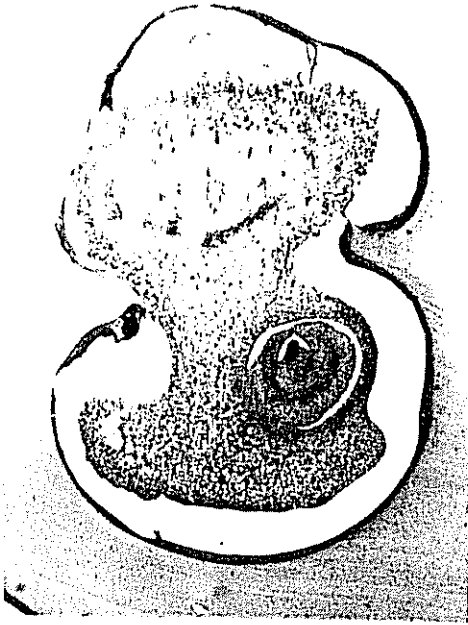
Figura 12. Formación de callo en embriones cigóticos de *M. acuminata* ssp. *malacensis* en condiciones de luz y oscuridad

Figura 13. Corte longitudinal de un embrión somático maduro de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* mostrando la gémula (g) (33x).

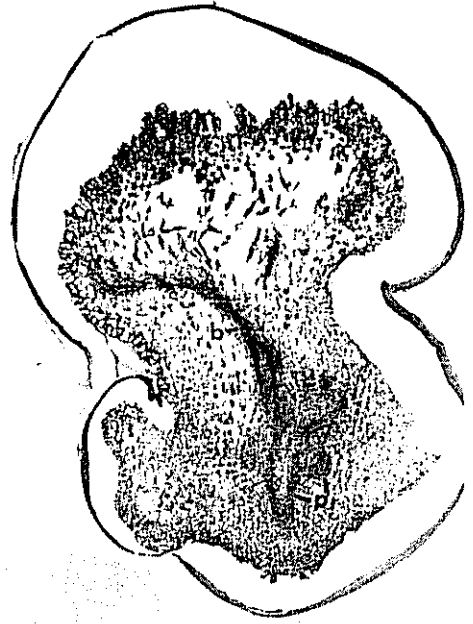
Figura 14. Corte longitudinal de un embrión somático maduro de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* con bandas procambiales (b) y polos radiculares (pr) (33x).

Figura 15. Corte longitudinal de un embrión somático de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* con fisura cotiledonaria (fs) (33x).

Figura 16. Corte longitudinal de un embrión somático de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* (33x).



13



14



15



16

Figura 17. Embrión somático germinado mostrando brotes múltiples (4x).

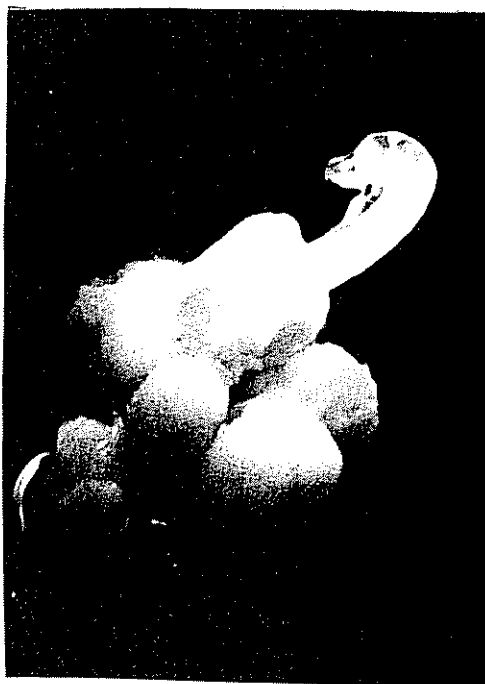
Figura 18. Embrión somático germinado mostrando un solo brote (4x).

Figura 19. Plántula proveniente de un embrión somático en medio basal (1x).

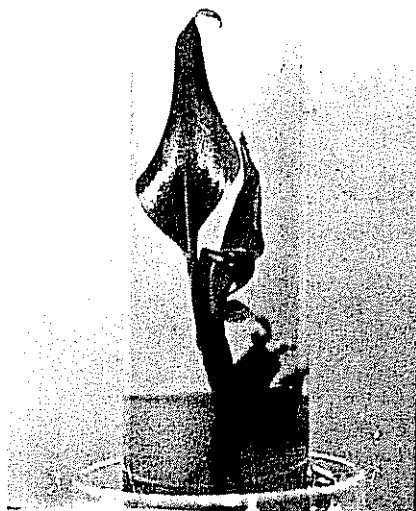
Figura 20. Plántulas provenientes de embriones somáticos en fase de aclimatación en invernadero.



17



18



19



20

4.3. Suspensiones celulares

4.3.1. Callos embriogénicos

De los medios de cultivo utilizados para inducir la formación de callo, solamente se obtuvieron callos en los embriones sembrados en el medio con picloram (2 mg l^{-1}). El porcentaje promedio de formación de callo estuvo entre 63-73%, y varió según las condiciones lumínicas. No se observó ninguna respuesta en los embriones sembrados en el medio con 2,4-D, por lo que estos tratamientos fueron descartados.

De manera semejante al caso anterior, los primeros indicios de formación de callo se observaron después de cuatro y cinco semanas de sembrados los explantes. Nuevamente el callo se inició como una pequeña protuberancia globular semejante al desarrollo o maduración de un embrión cigótico de *Musa*. Más tarde se formaron múltiples estructuras globulares y alargadas de color blanco y conforme avanzó la edad del callo este fué aumentando de tamaño y haciéndose más friable.

También la coloración del callo varió de acuerdo a la condición lumínica. Los callos que se formaron en luz presentaban coloración blanca, amarilla y verde-amarilla; y

los formados en oscuridad, una coloración blanca y café. No se observaron diferencias en la friabilidad y textura del callo con respecto a la condición lumínica. Esto pudo confirmarse histológicamente (sección 4.2.5.).

4.3.2. Callos en suspensión

De los medios utilizados para iniciar las suspensiones celulares (Cuadro 3. Materiales y Métodos), el medio con picloram dio los mejores resultados. Los callos iniciados en el medio con picloram y luego transferidos al medio líquido con 2,4-D con frecuencia se oxidaron rápidamente, tornándose cafés o negros después de una semana.

La facilidad con que se presentó la liberación de células al medio líquido varió con la edad y el tipo de callo. Los callos más jóvenes (Fig. 8) formaron suspensiones menos densas y demoraron más tiempo en formar una suspensión. Conforme avanzó la edad del callo las suspensiones obtenidas fueron más densas y se establecieron con más rapidez. Sin embargo con callos de más de 20 semanas de edad, por su estructura y aspecto compacto (Fig. 11), fué difícil lograr el establecimiento de suspensiones densas.

4.3.3. Iniciación y comportamiento de las suspensiones

Como lo indica el cuadro 7 hubo diferencias en el crecimiento de las suspensiones a lo largo del tiempo. El cálculo de la regresión entre volumen celular y tiempo de cultivo permitió visualizar el crecimiento de las suspensiones celulares. De las 21 suspensiones iniciadas solo siete presentaron un aumento de más de 10 $\mu\text{l/ml}$ con respecto al volumen inicial: la 5, 7, 9, 11, 12, 13 y 15 (Fig. 21-23). Estas fueron establecidas con callos de 5, 7, 9, 11, 12, 13 y 15 semanas de edad respectivamente. Las suspensiones que se iniciaron con callos de 6, 10, 16 y 17 semanas de edad mostraron muy poco aumento del volumen celular. Otras suspensiones como la 3, 4, 8, 18, 19 y 21 mostraron un decrecimiento en el volumen celular. Estas últimas también se oxidaron con el tiempo (Fig. 24).

Cuadro 7. Promedio semanal de aumento de volumen $\mu\text{l/ml}$) y aumento neto de volumen celular después de 12 semanas de suspensiones iniciadas con callos de 3 a 21 semanas de edad.

Edad del callo con el que se inició la suspensión (sem.)	Promedio semanal de aumento de volumen celular ($\mu\text{l/ml}$).	Aumento neto de volumen celular después de 12 semanas ($\mu\text{l/ml}$)
3	-0.1364	-1.5
4	-0.2545	-2.8
5	1.2182	13.3
6	0.3636	4.0
7	7.2727	80.0
8	-0.9545	-10.5
9	1.8455	20.3
10	0.0909	1.0
11	1.3636	15.0
12	4.3636	48.0
13	7.7273	85.0
15	1.3909	15.3
16	0.3818	4.2
17	0.8545	9.4
18	0.4818	-5.3
19	-0.2429	-1.7
20	2.53	25.3
21	-0.3571	-2.5

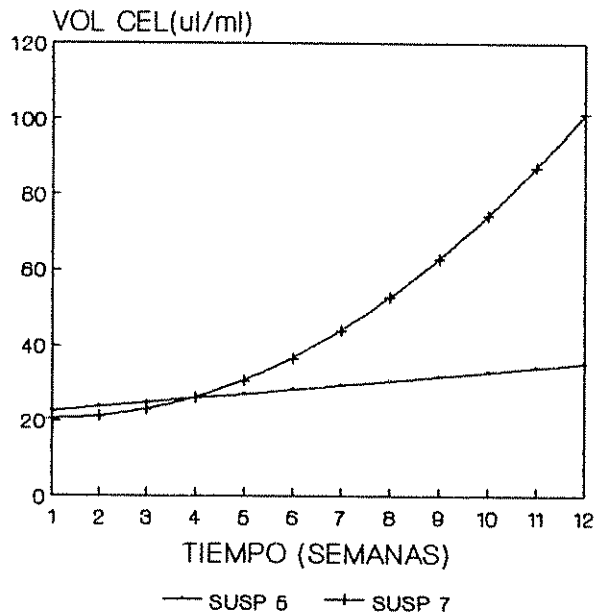


Figura 21. Regresión entre volumen celular y tiempo de las suspensiones 5 y 7.

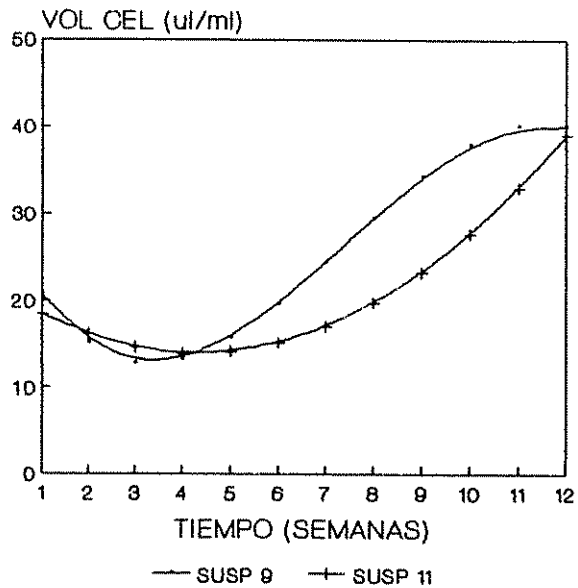


Figura 22. Regresión entre volumen celular y tiempo de las suspensiones 9 y 11.

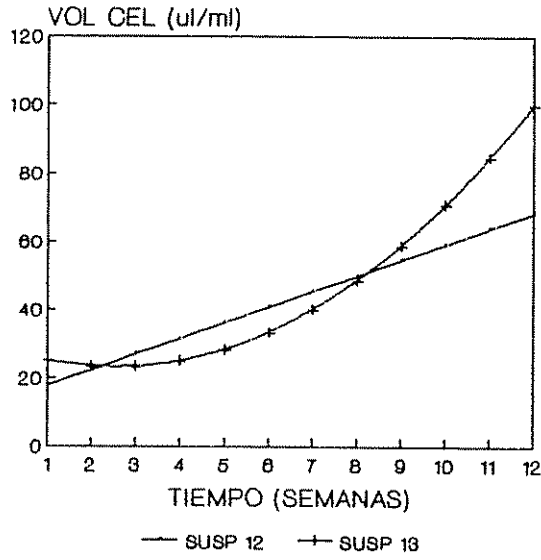


Figura 23. Regresion entre volumen celular y tiempo de las suspensiones 12 y 13.

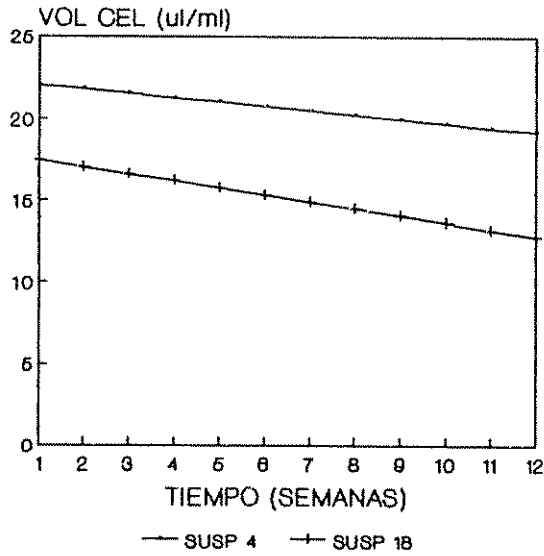


Figura 24. Regresion entre volumen celular y tiempo de la suspensiones 4 y 18.

Se observó la formación de embriones somáticos en las suspensiones 7,9,11, 12 y 13. Sin embargo, en las suspensiones 7, 12 y 13, se obtuvo formación de hasta 200 y 300 embriones somáticos por 30 ml de suspensión. El tiempo transcurrido desde que se filtró la suspensión hasta la aparición de los primeros embriones varió entre las suspensiones. Se observó la formación de los primeros embriones en la suspensión 13 después de 3-4 semanas de filtrada por lo que fué necesario volver a filtrar la suspensión para que no interfirieran en la medida del volumen celular. En las suspensiones 7 y 9 los primeros embriones se hicieron visibles después de aproximadamente 6 semanas de iniciada la suspensión. Y en las suspensiones 11 y 12 se observó la aparición de embriones hasta casi después de 12 semanas.

Fue frecuente observar un color amarillo en las suspensiones que luego formaron embriones. En un principio se pudo observar la aparición de pequeñas estructuras globulares de color blanquecino en el medio líquido. La formación espontánea de estas estructuras no se presentó simultáneamente en todas las suspensiones ni en la misma suspensión. Estas estructuras fueron aumentando de tamaño al mismo tiempo que se observó la continua formación de nuevos

embriones. En una misma suspensión fue posible observar embriones somáticos en distintos estados de desarrollo.

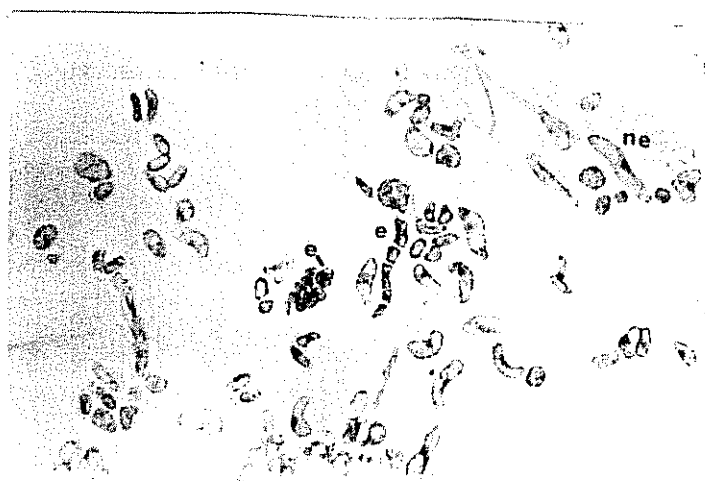
Las suspensiones en las que decreció el volumen celular, usualmente se tornaron cafés y oscuras como resultado de la oxidación. Aunque el medio de cultivo era cambiado cada 15 días, una vez detectada la oxidación no se pudo controlar.

Las preparaciones frescas al microscopio de las suspensiones embriogénicas mostraron una gran cantidad de células en división así como la existencia de estructuras proembrionarias en distintos estados de desarrollo. Se pudo observar proembriones de dos, cuatro, seis y más células rodeadas por una misma membrana (Figs. 25 y 26 a,b,c y d).

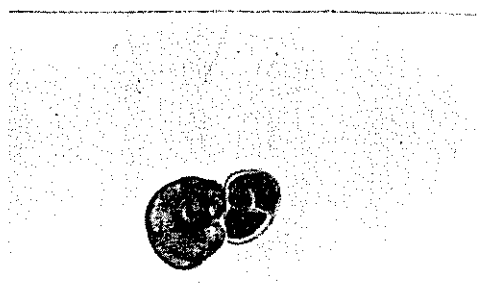
En las suspensiones iniciadas con callos fuera del intervalo de 7 a 13 semanas, no se produjo la formación de embriones somáticos. Las suspensiones donde se observó la formación de estructuras globulares fueron filtradas, recogiendo los embriones somáticos para luego ser colocados en un medio de germinación. El filtrado, después de cambiado el medio y colocado nuevamente en agitación, mostró nuevamente la producción de múltiples embriones en el medio líquido. La capacidad embriogénica de la suspensión original se mantuvo aún después de filtrada la suspensión.

Figura 25. Vista general de células en suspensión mostrando células embriogénicas (e) y no embriogénicas (ne) (82,5x).

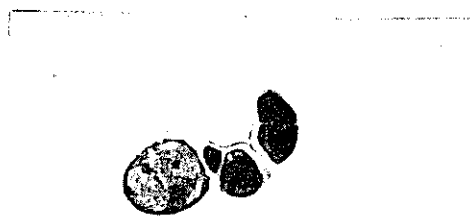
Figura 26a, b y c. Células embriogénicas en distintos estados de división (190x); 26d. proembrión (165x).



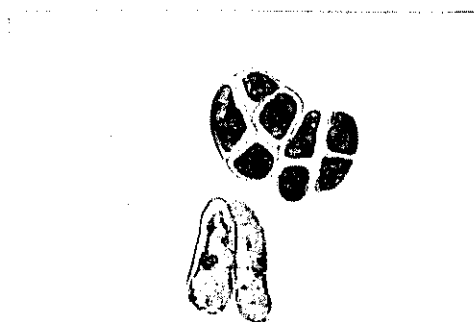
25



26a



26b



26c



26d

4.3.4. Germinación de los embriones producidos en las suspensiones celulares

Los embriones somáticos producidos en las suspensiones celulares y luego sembrados en medio de germinación (Cuadro 1, medio 2) mostraron diferentes rutas de desarrollo. Una parte de los embriones somáticos germinaron y otros formaron callo (Figs. 27 a,b y c). Los porcentajes de germinación de los embriones procedentes de una misma suspensión oscilaron entre 4.2-36% (Cuadros 8,9 y 10). El promedio de germinación de las suspensiones 7, 12, y 13 fue respectivamente 12.5, 22.6 y 21.4%. El ANDEVA para las variables porcentaje de germinación y formación de callo, no mostró diferencias significativas (al 0,01) entre las suspensiones 7, 12 y 13 (Cuadro 11).

Los embriones que germinaron inicialmente mostraron un cambio de coloración tornándose amarillos y verde claros; también se registró un aumento en su tamaño. Después de 3-4 semanas se observó la emergencia de la plúmula en algunos de los embriones (Figs. 28 y 29). La germinación de los embriones no ocurrió simultáneamente.

El callo formado fue de color blanquecino y con múltiples estructuras globulares. Se pudo observar al

estereoscopio que algunas de estas estructuras eran blancas y translúcidas con una invaginación que semeja a la fisura cotiledonaria de los embriones cigóticos.

Cuadro 8. Porcentajes de germinación, formación de callo y oxidación a partir de embriones somáticos producidos en la suspensión 7.

Rep.	No. emb. sembrados	Callo		Oxidación		Germinación	
		No.	%	No.	%	No.	%
1	22	14	63.6	8	36.4	0	0
2	24	10	41.7	7	29.2	7	29.2
3	11	7	63.6	0	0	4	36.4
4	24	14	58.3	9	37.5	1	4.2
5	16	12	75	3	18.8	1	6.2
6	32	16	50	12	37.5	4	12.5
7	37	29	78.4	4	10.8	4	10.8
8	26	22	84.6	0	0	4	15.4
9	27	27	100	0	0	0	0
10	59	50	84.7	3	5.1	6	10.2
Total = 278		$\bar{X} = 70$		$\bar{X} = 17.5$		$\bar{X} = 12.5$	

Cuadro 9. Porcentajes de germinación, formación de callo y oxidación a partir de embriones somáticos producidos en la suspensión 12.

Rep.	No. emb. sembrados	Callo		Oxidación		Germinación	
		No.	%	No.	%	No.	%
1	37	22	59.5	5	13.5	10	27
2	41	28	68.3	2	4.9	11	26.8
3	36	27	75	2	5.6	7	19.4
4	47	32	68.1	6	12.8	9	19.1
5	43	29	67.4	5	11.6	9	20.9
Total = 204		$\bar{X} = 67.6$		$\bar{X} = 9.7$		$\bar{X} = 22.6$	

Cuadro 10. Porcentajes de germinación, formación de callo y oxidación a partir de embriones somáticos producidos en la suspensión 13.

Rep.	No. emb. sembrados	Callo		Oxidación		Germinación	
		No.	%	No.	%	No.	%
1	39	25	64.1	6	15.4	8	20.5
2	49	38	73.5	2	4.1	9	22.4
3	47	28	59.6	5	10.6	14	29.8
4	41	28	68.3	10	24.4	3	7.3
5	36	26	72.2	4	11.1	6	16.7
6	35	24	68.6	0	0	11	31.4
Total = 247		$\bar{X} = 67.7$		$\bar{X} = 10.9$		$\bar{X} = 21.4$	

Cuadro 11. ANDEVA para las variables porcentaje de germinación y porcentaje de formación de callo a partir de embriones somáticos producidos en las suspensiones 7, 12 y 13.

Variable	FV	GL	F	PR>F	CV
% Germ.	Susp	3	2.42 _{ns}	0.0934	37%
% Callo	Susp	3	0.22 _{ns}	0.8844	19%

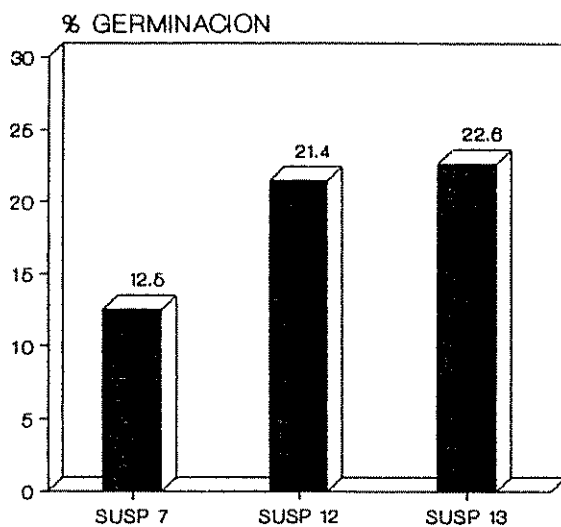


Fig. 27a. Porcentaje de germinación de los embriones somáticos producidos en las suspensiones 7, 12 y 13.

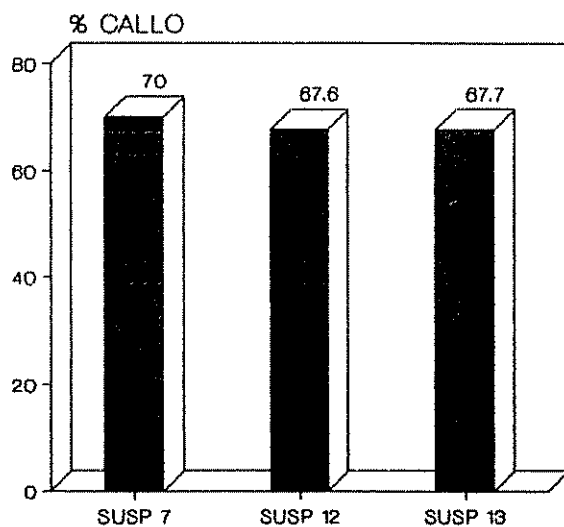


Fig. 27b. Porcentaje de formación de callo a partir de embriones somáticos producidos en las suspensiones 7, 12 y 13

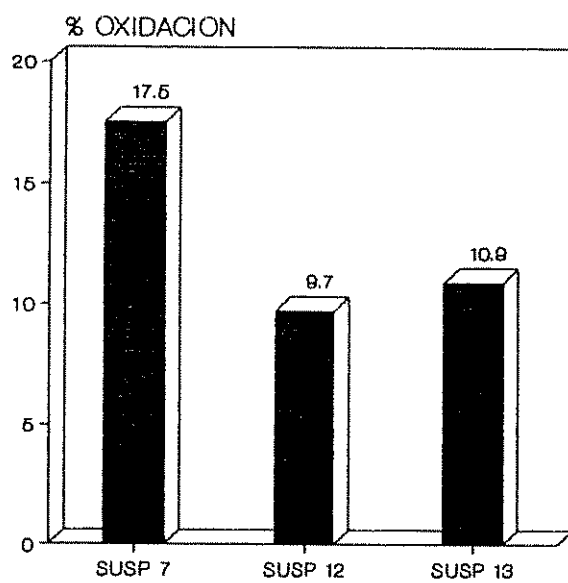


Fig. 27c. Porcentaje de oxidación de los embriones somáticos producidos en las suspensiones 7, 12 y 13.

4.3.5. Cultivo del filtrado de las suspensiones

Aproximadamente 15 días después de inocular las alicuotas de las células en suspensión en los medios sólidos 1 y 2 (Cuadro 1, Materiales y Métodos), se pudo observar la formación de pequeñas estructuras globulares en la superficie del medio (Figs. 30 y 31). Estas estructuras no se observaron en todos los casos sino principalmente en el cultivo realizado con las suspensiones 7, 12, 13, 17 y 21. Después de 4 semanas la evolución de estas estructuras permitió evidenciar la presencia de embriones somáticos. La formación de embriones somáticos se observó principalmente en el cultivo realizado con las suspensiones 7, 12 y 13. No hubo diferencia en la frecuencia de aparición de los embriones según el medio utilizado (Cuadro 12).

Cuadro 12. Número total de embriones somáticos formados por alicuotas de 0,5 ml de suspensión en dos medios de cultivo y tres repeticiones

Suspensión	Medio MS	Medio BA
7	57	64
12	41	53
13	65	73

Figura 28. Grupo de embriones somáticos germinando; g=gémula (10x).

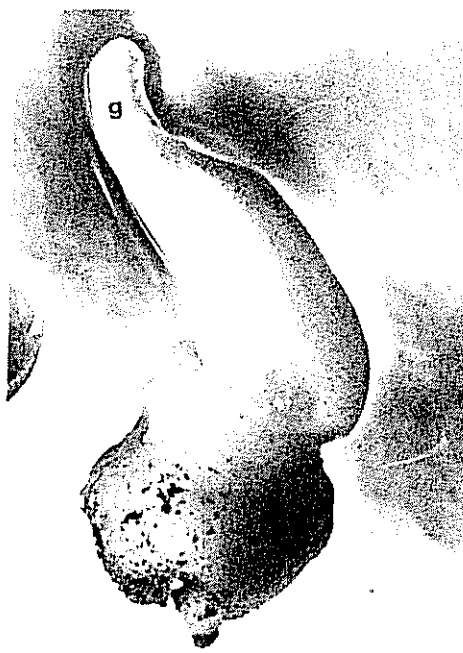
Figura 29. Embrión somático germinando mostrando la gémula (g) (10x)

Figura 30. Embriones somáticos formados 30 días después del cultivo de las alicuotas de filtrado de las suspensiones sobre medio sólido (0.5x).

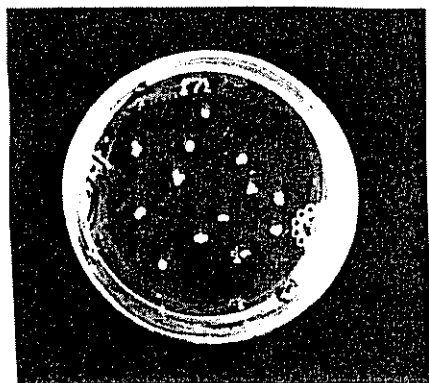
Figura 31. Embriones somáticos (e) formados después del cultivo de las alicuotas de filtrado de las suspensiones en medio sólido (18x).



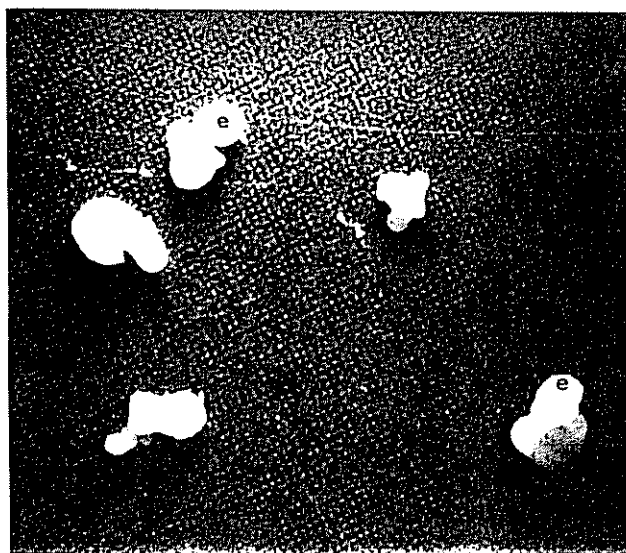
28



29



30



31

4.4. Estudio histológico del callo embriogénico

4.4.1. Microscopía de luz

La histología mostró que los embriones cigóticos, al momento de ser inoculados, eran inmaduros y sin diferenciarse aún los primeros tejidos organizados. Los resultados histológicos sugieren que el embrión cigótico después de inoculado en el medio con picloram continúa su desarrollo hacia la maduración pero sin llegar a germinar.

Después de cuatro semanas de sembrados mostraron una forma globosa, donde se encuentran claramente definidos los meristemas radicales, meristemo apical, bandas procambiales y la región haustorial. En este estadio se observó mucha división celular en la periferia de la región haustorial (Fig. 32).

Después de cinco o seis semanas de sembrados los embriones, se observó la desorganización del tejido embrionario. La presencia de callo se hizo más visible, iniciándose su formación en la zona perivascular del haustorio (Fig. 33). Hay evidencia de zonas meristemáticas y se observó mucha división celular (Fig. 34). Sin embargo el callo aún sigue siendo muy compacto (Fig. 35).

A las siete semanas el callo fue menos compacto. Se hicieron visibles estructuras proembrionarias así como células conteniendo almidón (Fig. 36). A las ocho semanas se observó el inicio de la formación de callos a partir de la zona meristemática apical y de los tejidos perivasculares del haustorio (Fig. 37).

La desorganización del tejido es muy clara después de la novena semana de haberse inoculado el embrión (38). También se observaron embriones emergiendo y unidos en la base a manera de un ramillete (Figs. 39 y 40). Además fue evidente un alto contenido de almidón en algunas células.

En las siguientes semanas el callo aumentó de tamaño y se observó con claridad como cambiaba su organización. Los espacios intercelulares eran más grandes dando al callo un aspecto general suelto y sin mucha consistencia. Los callos en este estadio fueron difíciles de manejar puesto que son muy friables y se desmoronan con facilidad (Fig. 41). Los callos de más edad estaban muy diferenciados y se pueden observar traqueidas y xilema (Fig. 42).

4.4.2. Microscopía electrónica de rastreo

Las fotografías de microscopía electrónica revelaron la presencia de estructuras proembrionarias y embrionarias en diferentes estados de desarrollo, tanto en la embriogénesis somática a partir de callo como en las suspensiones celulares. Se pudo observar glóbulos o proembriones en grupo o aislados sugiriendo las primeras etapas de embriogénesis somática (Figs. 43 a y b). También se observó con frecuencia la formación de embriones somáticos adventicios sobre otros embriones (Fig. 43c). Los embriones somáticos maduros cobran una forma más alargada haciéndose más evidente una apariencia bipolar (Fig. 43 d).

Figura 32. Corte mostrando división celular en la periferia de la región haustorial del embrión cigótico (370x).

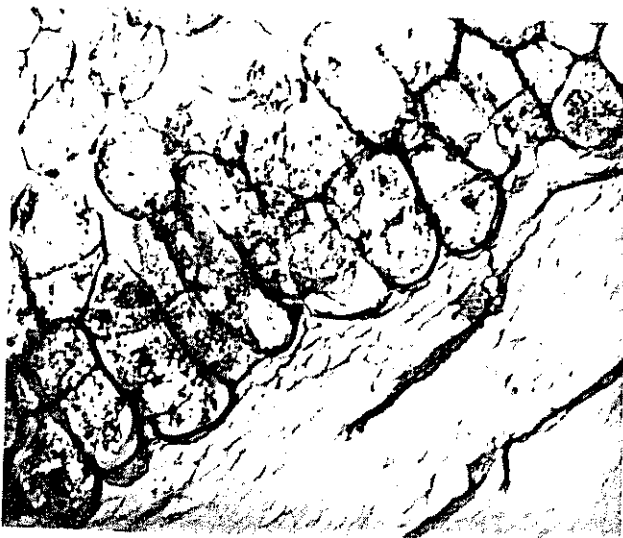
Figura 33. Corte histológico mostrando el inicio de la formación de callo en la zona perivascular del haustorio del embrión cigótico; d=división celular (370x).

Figura 34. Corte histológico de zona meristemática con mucha división celular (370x).

Figura 35. Corte histológico de callo compacto (c) (210x).

Figura 36. Corte histológico mostrando estructuras proembrionarias (pe) en la periferia de un embrión cigótico (370x).

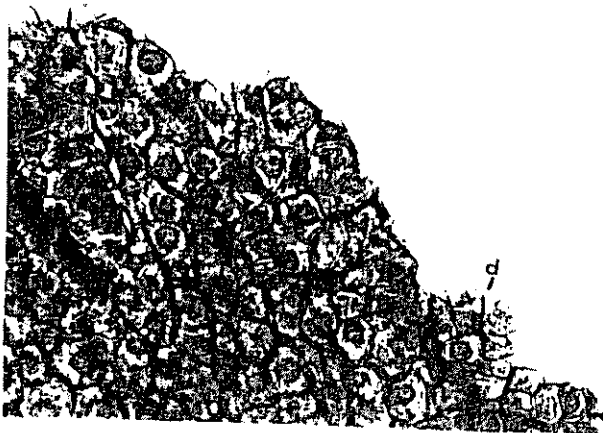
Figura 37. Corte histológico mostrando callo (c) que se forma a partir de los tejidos perivascuales del embrión cigótico (185x).



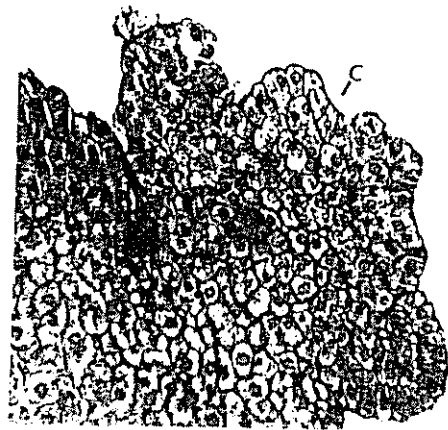
32



33



34



35



36



37

Figura 38. Corte histológico mostrando callo después de 9 semanas de sembrado (43x).

Figura 39. Corte histológico mostrando conjunto de embriones somáticos (e) (33x).

Figura 40. Corte histológico mostrando embriones somáticos (e) (33x).

Figura 41. Corte histológico mostrando aspecto general de un callo friable (165x).

Figura 42. Corte histológico de callo de 25 semanas mostrando traqueidas (185x).



38



39



40

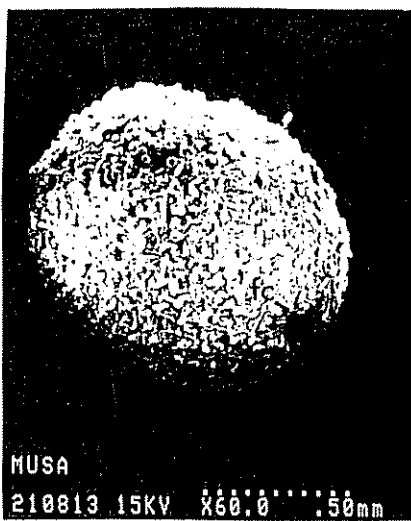


41



42

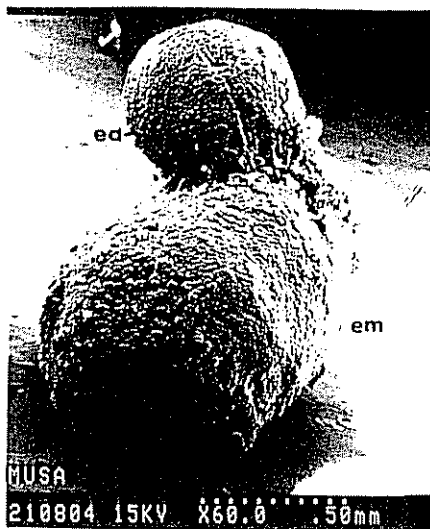
Figura 43. Micrografías de microscopía electrónica de rastreo
a. Proembrión mostrando fisura cotiledonaria (fc); b.
conjunto de embriones mostrando embriogénesis somática
adventicia; c. embrión adventicio emergiendo (ea) sobre
embrión madre (em); d. embrión somático (e); e. gémula
emergiendo de embrión somático (g).



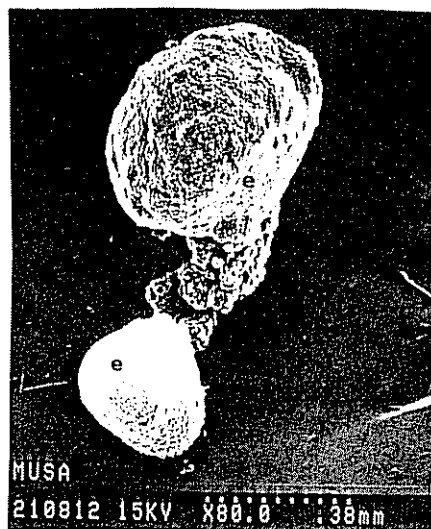
43a



43b



43c



43d



43e

5. DISCUSION

5.1. Desarrollo *in vivo* del embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis*

El estudio del desarrollo del embrión cigótico de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* permitió determinar de manera más precisa el estadio de desarrollo del material que se usó para la iniciación de callos.

Al comparar los resultados de histología con los descritos por Bouharmont (1963) en embriones de *M. acuminata* ssp. *burmannica*, se pudo observar que los embriones cigóticos colectados en las condiciones de campo del CATIE, presentaron un desarrollo más lento. Los embriones de 40 y 50 días corresponden más a la descripción de "masa pluricelular no diferenciada" o proembrión que reporta Bouharmont de los embriones de 25 días. En estos estadios el proembrión aparece como una estructura globular no diferenciada donde no se reconocen tejidos organizados.

De la misma manera los embriones de 60 días presentaron una apariencia más asimétrica y en forma de copa que Bouharmont describe en los embriones de 50 días. Los embriones de 70 días apenas comenzaban a diferenciarse pero

sin mostrar la forma de "hongo" que este mismo autor describe en embriones de esta edad. En embriones de 120 días fue posible observar el embrión con la morfología típica de un embrión maduro con la porción haustorial y el eje epicótilo-hipocótilo-radicular.

El atraso observado en el desarrollo de los embriones cigóticos en las condiciones de campo del CATIE posiblemente se deban a factores ambientales como temperatura y prácticas de manejo de la colección. Estas diferencias también pueden ser de genotipo, puesto que Bouharmont trabajó con *M. acuminata ssp. burmannica*.

Vasil (1985) indica que el estado de desarrollo del explante utilizado ha sido el factor más crítico para la obtención de una respuesta óptima en el establecimiento de callos embriogénicos en algunos cereales. La utilización de embriones inmaduros (10-14 días después de la polinización) en *Panicum maxicum*, *Triticum aestivum*, y *Pennisetum americanum* ha resultado en una mejor respuesta embriogénica.

Los análisis histológicos revelaron que el estado de desarrollo de los embriones cigóticos empleados en este estudio correspondía a un estado de proembrión. Este hecho junto con los reguladores de crecimiento del medio, ha sido

probablemente un factor importante para que el explante alcance la competencia embriogénica.

Los resultados de este estudio permiten resaltar la importancia del estudio de la embriogénesis cigótica como trabajo preliminar en la búsqueda de embriogénesis somática. Por eso es recomendable realizar este tipo de estudio al trabajar con otras especies de *Musa* debido a las diferencias que pueden existir entre ellas.

5.2. Embriogénesis somática en medio sólido

Los porcentajes de formación de callo obtenidos a partir de los embriones cigóticos inmaduros (73% en luz y 63% en oscuridad) fueron mayores que otros reportados anteriormente. Escalant y Teisson (1989) reportaron 32% de formación de callo a partir de embriones de *M. acuminata* y *M. balbisiana* de 45 días, y 16% a partir de embriones de 25 días, todos cultivados en oscuridad.

Aunque con frecuencia la inducción de callo se realiza en condiciones de oscuridad, se encontró una mejor respuesta en la formación de callos en condiciones de luz. Esto coincide con lo que se ha encontrado en algunas variedades de

trigo (Rashid y Quraishi, 1989); de arroz (Yoshida et al., 1983; Hanning y Nabors, 1989) y en otras gramíneas.

Aunque no se observaron diferencias en cuanto a la competencia embriogénica de los callos producidos en luz y oscuridad, el color amarillo observado en los callos producidos en condiciones de luz ha sido considerado por algunos autores como un indicador morfológico de callos embriogénicos (Vasil, 1985). La formación de callo embriogénico amarillo también ha sido descrita en embriones cigóticos de *M. ornata* (Cronauer y Krikorian, 1988) y en embriones cigóticos de *M. acuminata* ssp. *burmannica* tipo Long Tavoy y *M. balbisiana* tipo Lat Velchi (Escalant y Teisson, 1989). Esta coloración amarilla posiblemente está relacionada con un incremento en las sustancias de reserva (principalmente almidón y proteínas) que ocurre en los callos que alcanzan competencia embriogénica (Escalant, comunicación personal).

5.2.1. Formación de embriones somáticos

La formación de embriones somáticos de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* resultó de una embriogénesis somática indirecta con fase intermediaria de callo. El efecto del picloram en la inducción de la embriogénesis somática de *Musa* ya ha sido

demostrado anteriormente (Escalant, 1987; Escalant y Teisson, 1987; Escalant y Teisson, 1989), sin embargo en este estudio se observó que la disminución de la concentración de picloram en el medio fue esencial para la formación de embriones somáticos en forma numerosa. Esto concuerda con otros resultados donde ha sido necesario reducir o eliminar el nivel de auxina exógeno para que se produzca la formación de embriones somáticos (Krikorian y Kann, 1981; Vasil, 1985; Ammirato, 1986).

La producción de proembriones y su subsecuente crecimiento y desarrollo en embriones somáticos, sugiere que los genes que controlan la formación de embriones han sido activados durante el proceso de cultivo (Borkird *et al.*, 1988).

La aparición de múltiples estructuras globulares de diferentes tamaños sobre el explante indica que una vez iniciado el proceso embriogénico, la formación de embriones es continua y constante. Por esto es posible observar embriones en diferentes estados de desarrollo en el mismo explante. Este fenómeno puede estar asociado también a mecanismos de regulación genética existentes en las células del embrión cigótico.

La formación de embriones "adventicios" observada en este estudio, también ha sido reportada en otros estudios de embriogénesis somática de *Musa* (Sannasgala, 1989; Dhed'ea et al., 1991). Este proceso se manifiesta por la emergencia de una protuberancia globular sobre el embrión "madre". Los proembriones que se forman de esta manera permanecen adheridos en la base al embrión "madre" formandose así grupos de proembriones.

Haccius (1978), considera la proliferación de proembriones o embriones somáticos en cultivo como un proceso análogo a la poliembrionía observada en embriones cigóticos de gimnospermas, donde los embriones emergen de un complejo celular poliembriogénico.

Sannasgala (1989) considera que esta proliferación de estructuras proembrionarias, también reportada por Cronauer y Krikorian (1983) así como por Escalant y Teisson (1989), puede ser de importancia práctica en micropropagación. Esta podría ser una alternativa útil en micropropagación, solamente si se logra controlar la variabilidad genética que generalmente acompaña a las plántulas regeneradas por la vía de embriogénesis somática (Ammirato, 1987).

5.2.2. Germinación de los embriones somáticos

Aunque la presencia de citoquininas en el medio no fué esencial para la germinación de los embriones somáticos, se observó un mayor porcentaje de germinación en los embriones sembrados en el medio con BA.

El inicio de la germinación de los embriones estuvo acompañado de un cambio de color a blanco-amarillo y de un engrosamiento como el descrito por Cronauer y Krikorian (1988) en embriones somáticos de un triploide (ABB). En el proceso de germinación se observó primero el desarrollo de la gémula y luego la aparición de las primeras raíces adventicias, muy semejante a la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *M. balbisiana* descrito por Escalant y Teisson (1987).

La formación de brotes múltiples en los embriones sembrados en el medio 2, posiblemente se debió a la presencia de BA en el medio. Esta proliferación de brotes a partir de un solo embrión permite la obtención rápida de varios individuos a partir de un solo embrión somático, y así acelerar la obtención de un clon.

5.3. Iniciación de callos embriogénicos para el establecimiento de suspensiones celulares

Aunque el picloram y el 2,4-D son considerados como reguladores de crecimiento que actúan como auxinas fuertes (Eisinger y Morré, 1971; Kefford y Casso, 1966), solamente se observó la formación de callo en los embriones cigóticos sembrados en el medio con picloram. Esto posiblemente se debió a que la concentración de 2,4-D en el medio no fue la apropiada para desencadenar el proceso embriogénico. Se ha observado que la degradación del 2,4-D en el medio de cultivo ocurre rápidamente; después de cuatro días, la concentración de 2,4-D puede disminuir hasta una décima parte de la concentración original (Escalant, comunicación personal). Para contrarrestar este efecto, se puede transferir periódicamente el explante a medio fresco, para así mantenerlo en contacto con una concentración de 2,4-D cercana a la deseada.

En palmas de *Euterpe edulis* se ha observado que el nivel de 2,4-D para inducir embriogénesis en embriones cigóticos inmaduros oscila entre 50-100 mg l⁻¹ (Guerra *et al.*, 1991). Esta concentración es bastante elevada si se compara con los niveles requeridos para inducir embriogénesis en otras

monocotiledoneas, como por ejemplo en muchas de las gramíneas.

5.3.1. Callos en suspensión

Con frecuencia las suspensiones celulares se inician transfiriendo porciones de callo friable a medio líquido y colocándolos en agitación.

El éxito de este estudio, en el establecimiento de las suspensiones varió dependiendo de la edad del callo y reguladores de crecimiento utilizados en el medio de las suspensiones. El medio de cultivo más apropiado para las suspensiones celulares fue una modificación del medio en el que se inició la formación de callo.

Los callos obtenidos en presencia de picloram y luego transferidos a un medio líquido con 2,4-D se oxidaron. Esto probablemente se debió a una reacción de las células del callo ante el cambio de la fuente de auxina exógena.

La edad del callo tuvo una marcada influencia en la facilidad y rapidez con que se produjo la liberación de células en el medio. Los callos jóvenes (1-6 semanas) formaron suspensiones poco densas y demoraron mucho tiempo en

formar una suspensión. La mayoría de los callos en un rango de edad entre 7-13 semanas eran más friables, disgregándose con facilidad en el medio para formar rápidamente suspensiones celulares con alto potencial embriogénico.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio histológico, donde claramente se pudo observar que los callos más jóvenes presentaron una estructura muy compacta con predominancia de células meristemáticas. Sin embargo, conforme avanzó su edad, la desorganización del tejido fue evidente. El callo se hizo más friable. De esta manera las células aisladas y no organizadas en un tejido pudieron alcanzar la competencia embriogénica. Esto explica perfectamente la importante liberación de células embriogénicas, lo cual permitió el establecimiento de las suspensiones celulares.

5.3.2. Comportamiento de las suspensiones celulares

Las diferencias observadas en el comportamiento y crecimiento de las suspensiones celulares parecen estar relacionadas con la edad del callo que se utilizó para iniciarlas.

Las suspensiones iniciadas con callos de 7-13 semanas de edad fueron las que mostraron el mayor crecimiento. Fue también en suspensiones iniciadas con callos entre este intervalo de edad donde se observó la formación de numerosos embriones somáticos. El incremento en el crecimiento celular así como la presencia de células embriogénicas en constante división acompañaron con frecuencia la formación de embriones somáticos en estas suspensiones.

Lo anterior sugiere que la edad del callo juega un papel muy importante en la formación de suspensiones embriogénicas. Así, las suspensiones iniciadas con callos entre 7 a 13 semanas de edad, fueron en las condiciones experimentales del CATIE, las más apropiadas para la producción de embriones somáticos en medio líquido.

La formación de embriones somáticos se produjo espontáneamente en medio líquido sin reducir la concentración de picloram con respecto a la concentración en el medio original. Se ha encontrado que los niveles de auxina disminuyen rápidamente en el medio líquido debido al continuo y rápido metabolismo durante el crecimiento celular (Vasil, 1985).

Estudios realizados en *Musa* sobre los cambios en la concentración de picloram en el medio líquido en condiciones de luz, han permitido determinar que después de una semana de cultivo, la concentración inicial de picloram se reduce a una décima parte con respecto a la concentración inicial (Teisson, comunicación personal). Esta disminución del nivel de auxina en el medio, fue un factor que promovió la formación de embriones somáticos en la suspensión. Esta disminución del nivel de auxina pudo ser el factor que promovió la diferenciación de embriones somáticos.

La presencia de proembriones y embriones en distintos estados de desarrollo resulta de la asincronía que se tiene en las divisiones celulares en la suspensión. Este es un problema mencionado en muchas otras especies (Ammirato, 1974, 1977, 1986; Vasil y Vasil, 1981, 1982, 1985; Lutz *et al.*, 1985).

Es importante considerar modificaciones en las técnicas de cultivo para alcanzar un desarrollo más sincronizado de los embriones. EL ABA ha resultado útil para modular la embriogénesis somática inhibiendo la germinación precoz de los embriones durante su desarrollo (Ammirato, 1974, 1985; Vasil y Vasil, 1982; Ranch *et al.*, 1985). El uso de elevadas concentraciones de osmoreguladores como sacarosa o algunos

hexosítoles (sorbitol, manitol, inositol) también parecen tener un efecto modulador sobre la embriogénesis (Ammirato y Steward, 1971). También podría investigarse procedimientos de separación física, como la filtración, para aislar embriones por tamaño y obtener poblaciones más uniformes.

5.4. Germinación de los embriones producidos en suspensiones celulares

Aunque los porcentajes de germinación obtenidos son bajos (20-36%) resultan mayores que los reportados en otras investigaciones realizadas en *Musa*: 1.5-12% (Novak *et al.*, 1989) y 10-14% (Dhed^a *et al.*, 1991).

El estudio histológico confirmó la presencia de embriones somáticos en distintos estados de diferenciación. Por esto muchos de los embriones que fueron inducidos a germinación aún no estaban diferenciados. Esto explica el bajo porcentaje de germinación y el alto porcentaje de formación de callo.

Otros trabajos en *Musa* (Novak *et al.*, 1989; Dhed^a *et al.*, 1989) muestran que la presencia de citocininas es importante para la maduración y germinación de los embriones somáticos. En otras especies se ha demostrado la importancia

de ABA y manitol (Nadel *et al.*, 1989) para la diferenciación y subsecuente germinación de embriones somáticos.

Modificaciones, como las mencionadas anteriormente, en los medios de diferenciación, permitirían lograr una mayor sincronización en el proceso de diferenciación y así poder incrementar los porcentajes de germinación.

Por otro lado, la presencia de embriones somáticos que se observo en los callos producidos por los embriones que no germinaron sugiere que el proceso embriogénico continúa.

5.5. Cultivo del filtrado de las suspensiones

La formación de numerosos embriones somáticos a partir de alícuotas de 0,5 ml de suspensión permite tener una idea del alto potencial embriogénico de las suspensiones. Nuevamente en las suspensiones 7, 12 y 13 se produjo la formación de embriones somáticos confirmandose su capacidad embriogénica.

Las alícuotas de filtrado utilizadas para hacer el cultivo constituyen un material más uniforme, ya que por filtración se han separado físicamente proembriones y embriones de células y grupos de células. Este método

también puede ser utilizado para lograr un desarrollo más sincronizado de los embriones somáticos.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se presentan las siguientes conclusiones:

1. El callo embriogénico iniciado a partir de embriones cigóticos inmaduros mostró ser un excelente material para la iniciación de suspensiones celulares.
2. El medio más apropiado para la iniciación de callos embriogénicos fue el medio con picloram a 2 mg.l^{-1} .
3. Las condiciones de luz fueron las más apropiadas para obtener un mayor porcentaje (73%) de formación de callo embriogénico.
4. Los callos en un rango entre 7-13 semanas de edad fueron los más apropiados para iniciar suspensiones embriogénicas y obtener formación de embriones en medio líquido.
5. Se obtuvo la formación de suspensiones embriogénicas en la subespecie *Musa acuminata ssp. malaccensis*.

6. Se logró la regeneración de plantas completas a partir de suspensiones celulares a través de embriogénesis somática por primera vez en *M. acuminata ssp. malaccensis*.

7. El medio de germinación más apropiado para los embriones somáticos fué el medio con AIA (2 mg.l^{-1}) y BA ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$).

8. La presencia de citocininas en el medio de cultivo fue un factor benéfico pero no esencial en la germinación de los embriones somáticos.

La posibilidad de regenerar plantas completas a partir de suspensiones celulares embriogénicas abre una nueva perspectiva para el mejoramiento genético de los diploides de *Musa*. Las suspensiones celulares son un valioso material para investigar sobre la obtención y fusión de protoplastos, selección *in vitro* de variantes, variación somaclonal y técnicas de ingeniería genética. La simplicidad de esta técnica permitirá su integración en los programas de mejoramiento genético de *Musa*.

7. RECOMENDACIONES

En base a observaciones y experiencias obtenidas sobre la embriogénesis somática y suspensiones celulares en *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* se hacen las siguientes recomendaciones:

1. Investigar sobre el uso de ABA y hexosistoles en los medios de cultivo para alcanzar un desarrollo más sincronizado de los embriones.
2. Considerar procedimientos de separación física como filtración para separar embriones por tamaño y obtener poblaciones de embriones más uniformes.
3. Experimentar con el uso de antioxidantes en el medio de cultivo para disminuir la oxidación en las suspensiones.
4. Desarrollar otros métodos de regeneración de plántulas que incluyan la germinación en medio líquido.
5. Extender este método a otras especies diploides que son de interés en el mejoramiento genético de los bananos y plátanos.

6. Investigar la posibilidad de utilizar embriones somáticos como material para iniciar callos embriogénicos y posterior regeneración de plantas a partir de suspensiones. Esto permitiría alcanzar la formación de suspensiones celulares en cultivares triploides y tetraploides.

7. Evaluar en condiciones de campo las plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos, con el propósito de determinar la presencia de variabilidad genética y/o características de interés para el mejoramiento genético.

8. LITERATURA CITADA

- AMMIRATO, P.V.; STEWARD, F.C. 1971. Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. *Botanical Gazette*. 132:149-158.
- AMMIRATO, P.V. 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Botanical Gazette*. 135:328-337.
- AMMIRATO, P.V. 1977. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway: Effects of abscisic acid, zeatin and gibberellic acid. *Plant Physiology (EE.UU.)* 59:579-586.
- AMMIRATO, P.V. 1985. Patterns of development in culture. *In* Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Ed. by R. R. Henke; K.W.Hughes; M.J. Constantin; A. Hollaender; C.M. Wilson. Plenum Press, New York. p. 9-29.
- AMMIRATO, P.V. 1986. Carrot. *In* Handbook of Plant Cell Culture. Volume 4. Ed. by D.A. Evans; W.R. Sharp; P.V. Ammirato. Macmillan, New York. p. 457-499.
- AMMIRATO, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. *In* Plant Tissue and Cell Culture. Ed. by C.E. Green; D.A. Somers; W.P. Hachett; D.D. Biesboer. New York. p. 57-81.
- BAJAJ, Y.P.S. 1989. Induction and cryopreservation of somaclonal variation in wheat and rice. *In* Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-1988. Ed. by A. Mujeeb-Kazi y L.A. Sitch. CIMMYT. Mexico, D.F. p. 195-203.
- BAKRY, F.; ROSSIGNOL, L; 1985. Analyse des capacités de callogenèse et d'organogenèse obtenues à partir de différents tissus de bananiers (*Musa* ssp., Musacées). *Fruits (Francia)* 40(11):697-708.
- BAKRY, F.; LAVARDE-GUIGNARD, F.; ROSSIGNOL, L.; Y. DEMARLY. 1985. Développement de pousses végétatives à partir de la culture *in vitro* d'explants inflorescentiels de bananiers (*Musa* sp. Musacées). *Fruits (Francia)* 40(7-8):459-465.
- BANERJEE, N.; SCHOOF, J.; HOLLEVOET, S.; DUMORTIER, F.; DE LANGHE, E. 1987. Aspects and prospects of somatic embryogenesis in *Musa* ABB, cv. Bluggoe *Acta Horticulturae*. 212:727-728.

- BOUHARMONT, J. 1963. Evolution de l'ovule fécondé chez *Musa acuminata* Colla. subsp. *burmannica* Simmonds. La Cellule, LXIII, fascicule 2- Travaux biologiques de l'Institut J. B. Carnoy, (Francia) No. 84:261-279.
- BORKIRD, C.; CHOI, J.H.; JIN, Z.; FRANZ, G.; HATZOPOULOS, P.; CHORNEAU, R.; BONAS, U.; PELEGRI, F.; SUNG, R.Z. 1988. Developmental regulation of embryonic genes in plants. Proceedings National Academy of Sciences (EE.UU.) 85:6399-6403.
- CHAMPION, J. 1968. El plátano. Trad. por Fermin Palomeque. Barcelona, Editorial Blume. 247 p.
- CIRAD. LABORATOIRE DE CYTOGENETIQUE ET D'HISTOLOGIE VEGETALE (Francia). 1989. Manuel pratique d'histologie végétale. Montpellier. 61 p.
- CONGER, B.V. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press, Boca Raton. 273 p.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. 1983. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (*Musa* ABB). Plant Cell Reports (Alemania) 2:289-291.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. 1986. Banana (*Musa* spp.). In Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. I. Trees I. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 233-252.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. Plant Cell Reports (Alemania) 7:23-25.
- DE LANGHE, E. 1969. Bananas. In Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Ed. by F.P. Ferwerda y F. Wit. Wageningen, Netherlands. 511 p.
- DHEDA, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B.; VUYLSTEKE, D. Y DE LANGHE, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). Fruits (Francia) 46(2):125-135.
- EISINGER, W.R.; MORRE, D.J.. 1971. Growth regulating properties of picloram, 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid. Canadian Journal of Botany. 49:889-897.
- ESCALANT, J.V. 1987. Les bananiers diploides en culture *in vitro* (*M. acuminata* et *M. balbisiana*): Etude du comportement et recherche de variabilité. Ph. D. Thesis. Academie de Montpellier, France. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1987. Comportements *in vitro* de l'embryon isolé du bananier (*Musa* sp.) Fruits. 42 (6):333-342.
- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell reports (Alemania) 7:665-668.
- ESCALANT, J.V.; TAPIA, A.; SANDOVAL, J.; 1989. Inducción de callos, suspension de células y posibilidades de regeneración en *Musa* sp. previa presión de selección. Reunión ACORBAT 1989 (en impresión).
- ESAU, K. 1977. Anatomy of seed plants. 2 ed. John Wiley and Sons, Inc. New York (EE.UU.). 550 p.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; FLICK, C.E.; 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture. Ed. by T. Thorpe. New York, Academic Press. p. 45-113.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; DURZAN, D.J. 1991. Direct somatic polyembryogenesis in neotropic palms: *Euterpe edulis* Mart. In Abstracts of the Fourth Conference of the International Plant Biotechnology Network (IPBNet). San José, Costa Rica. s.p.
- HACCIUS, B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. Phytomorphology. 28:74-81.
- HANNING, G. Y M. NABORS. 1989. *In vitro* tissue culture selection for sodium chloride (NaCl) tolerance in rice and the performance of the regenerants under saline conditions. In Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-1988. Ed. by A. Mujeeb-Kazi y L.A. Sitch. CIMMYT. Mexico, D.F. p. 239-248.
- HENSHAW, G.G.; IHA, K.K.; MEHTA, A.R.; SHAKESHAFT, D.J. H.E. STREET. 1966. Studies on the growth in cell culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagation suspension cultures. Journal of Experimental Botany. 17:
- INIBAP. 1989. Looking ahead a strategy of choice. Montpellier, Francia. 71 p.

- JARRET, R.L.; FISHER, J.B.; R.E. LITZ; 1985. Organ formation in *Musa* tissue culture. *Journal of Plant Physiology* (EE.UU.) 121:123-130.
- JOHRI, B.M.; RAO, P.S. 1984. Experimental embryology. In *Embryology of angiosperms*. Ed. by B.M. Johri. New York, Springer Verlag. p. 735-802.
- KEFFORD, N.P. Y H. CASO. 1966. A potent auxin with unique chemical structure - 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid. *Botanical Gazette*. 127(2-3):159-163.
- KRIKORIAN, A.D.; KANN, K.P. 1981. Plantlet production from morphogenetically competent cell suspensions of Daylily. *Annals of Botany*. 47:679-686.
- KRIKORIAN, A.D. 1987. Callus and cell culture, somatic embryogenesis, androgenesis and related techniques for *Musa* improvement. In *Banana and plantain breeding strategies*. Ed. by G.J. Persley y E.A. De Langhe. ACIAR Proceedings. A.C.T. No. 21. p. 128-135.
- LUTZ, J.D.; WONG, J.R.; ROWE, J.; TRICOLI, D.M.; LAWRENCE, R.H.; 1985. Somatic embryogenesis for mass cloning of crop plants. In *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. Ed. by R.R. Henke; K.W. Hughes; M.P. Constantin; A. Hollaender. Plenum Press, New York. p. 105-116.
- MCGAHAN, M. W. 1961. Studies of the seed of banana. I. Anatomy of the seed and embryo of *Musa balbisiana*. *American Journal of Botany* (EE.UU.) 48:230-238.
- MOHAM RAM, H.Y.; STEWARD, F.C. 1964. The induction of growth in explanted tissue of the banana fruit. *Canadian Journal of Botany* 42:1559-1579.
- MOREL, G. 1950. Sur la culture des tissus de deux monocotylédones. *C.R. Acad. Sc. Paris*. 230:1099-1101.
- MURFETT, J. Y CLARKE, A. 1987. Producing disease-resistant *Musa* cultivars by genetic engineering. In *Banana and Plantain Breeding Strategies*. Ed. by G.J. Persley and E. De Langhe. ACIAR Proceedings, No. 21. p. 87-94.
- MURASHIGE, T. Y F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* (EE.UU.) 15:473-497.

- NADEL, B.L.; ALTMAN, A.; ZIU, M. 1989. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. I. Promoting effects of manitol on somatic embryo development. *Plant, Cell and Organ Tissue Culture*. 18:181-189.
- NARAYASWAMY, S. 1977. Regeneration of plants from tissue culture. *In Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Ed. by J. Reinert and Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag, Germany p. 179-248.
- NATESH, S.; RAU, M.A.; 1984. The embryo. *In Embryology of angiosperms*. Ed. by B.M. Johri. New York, Springer Verlag. p. 377-443.
- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M.; CONGER, B.V.; XIAOLANG, T. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Biotechnology (EE.UU.)* 7:154-159.
- PURSEGLOVE, J.W. 1972. *Tropical Crops. Monocotyledons*. Longman, Singapore. 607 p.
- RAGHAVAN. 1976. *Experimental embryogenesis in vascular plants*. London, Academic Press. 603 p.
- RANCH, J.P.; OGLESBY, L.; ZIELINSKI, A.C. 1985. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro Cell Development Biology (EE.UU.)* 21:653-658.
- RASHID, H.; QURAIISHI, A. 1989. *In Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-1988*. Ed. by A. Mujeeb-Kazi and L.A. Sitch. CIMMYT, México, D.F. p. 205-215.
- REINERT, J. 1958. Untersuchungen uber die morphogenese in gewebeulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71:15.
- REINERT, J.; YEOMAN, M.M. 1982. *Plant cell and tissue culture. A laboratory manual*. Springer-Verlag, Germany. p. 12-14.
- ROWE, P.R. 1985. *Mejoramiento de bananos y plátanos*. Unión de Países Exportadores de Banano (UPEB), Panamá. 19 p.
- ROWE, P.R.; RICHARDSON, D.L. 1975. *Breeding bananas for disease resistance, fruit quality and yield*. Las Lima, Honduras, Tropical Agriculture Service (SIATSA). 41 p.

- SANDOVAL, J. 1989. Estudio de la anatomía y morfología vegetativas de plantas de *Musa in vitro*, en condiciones de aclimatación y en el campo. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 178 p.
- SANNASGALA, K. 1989. *In vitro* somatic embryogenesis in *Musa*. Ph. D. Thesis. Leuven. Bélgica, Katholieke Universiteit Leuven. 172 p.
- SHEPHERD, K; LOYOLA D., J.L.; ALVES, J.E. 1986. Mejoramiento genético del banano. *In* Mejoramiento genético de banano y plátano en Brasil y Honduras. Ed. by Union de Países Exportadores de Banano (UPEB), Panamá. p. 1-19.
- SIMMONDS, N.W. 1962. The evolution of the bananas. John Wiley & Sons, Inc. New York. 170 p.
- SOTO, M. 1985. Bananos. Cultivo y Comercialización. Costa Rica. 627 p.
- SRINIVASA RAO, N.K.; CHACKO, E.C.; DORESWAMY, R. Y NARAYASWAMY, N. 1982. Induction of growth in explanted inflorescence axis of banana. *Curr. Sci.* 51:666-667.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany.* 45:705-708.
- STOVER, R.H.; BUDDENHAGEN, I.W. 1986. Fitomejoramiento del banano: ploiploidia, resistencia a enfermedades y productividad. *In* Mejoramiento genético de banano y plátano en Brasil y Honduras. Ed. por Unión de Países Exportadores de Banano (UPEB), Panamá. p. 20-55.
- STOVER, R.H.; SIMMONDS, N. W. 1987. Bananas. 3a ed. Longman Singapore Publishers. 468 p.
- TORREY, J.G.; J. REINERT. 1961. Suspension culture of higher plant cells in synthetic media. *Plant Physiology* 36:483-491.
- VASIL, I.K. Y V. VASIL. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Annals of Botany (G.B.)*. 47:669-678.
- VASIL, I.K. Y V. VASIL. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from inflorescences of *Penisetum americanum* (pearl millet; Gramineae). *American Journal of Botany (EE.UU.)* 69: 1441-1449.

- VASIL, I.K. 1985a. Toward the development of a single cell system for grasses. *In* Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. IRRI. Science Press. Beijing, China. p. 131-144.
- VASIL, I.K. 1985b. Somatic embryogenesis and its consequences in the graminea. *In* Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Ed. by R.R. Henke; K.W. Hughes; M.J. Constantin; A. Hollaender. Plenum Press, New York. p. 31-47.
- YOSHIDA, S.; OGAWA, M.; SUENAGA, K. Y CHUN YE, H. 1983. Induction and selection of salt-tolerant mutant rices by tissue culture. Recent progress at IRRI. *In* Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. IRRI. Science Press, Beijing, China. p. 237-254.

9. ANEXOS

Anexo 1A. Formulación de sales de Murashige y Skoog (1962).

Macroelementos

NH_4NO_3	1650 mg.l^{-1}
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Na_2EDTA	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8

Microelementos

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3 mg.l^{-1}
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025

Anexo 2A. Formulación de las vitaminas de Murashige y Skoog (1962).

Tiamina.HCl	10,00 mg.l ⁻¹
Acido nicotínico	0,50
Piridoxina.HCl	0,50
Mio-inositol	100,00
Glicina	2,00

Anexo 3A. Formulación de vitaminas de Morel (1950).

Pantotenato de calcio	1,00 mg.l ⁻¹
Mio-inositol	100,00
Acido nicotínico	1,00
Piridoxina.HCl	1,00
Tiamina.HCl	1,00
Biotina	0,01

Anexo 4A. PREPARACION DE CORTES HISTOLOGICOS

1. Cortes en parafina

1.1. Fijación

Las muestras fueron fijadas y conservadas en una solución de F.A.A. (10 ml de formalina, 80 ml de alcohol y 10 ml de ácido acético).

1.2. Deshidratación

- Etanol 70%	1 hr
- Etanol 80%	"
- Etanol 90%	"
- Etanol 95%	"
- Etanol 100%	"
- Etanol 100% + Tolueno	30 min
- Tolueno puro	1 hr
- Tolueno puro	"

1.3. Impregnación

- Tolueno + Parafina	30 min
- Parafina 55-60° C	1 hr
- Parafina 55-60° C	"
- Parafina 55-60° C	"

1.4. Inclusión en bloques de parafina

1.5. Realización de cortes en micrótomo manual de rotación

- Se hacen cortes de 8 μm de grosor
- Se colocan en portaobjetos cubiertos con formalina sobre una platina caliente a 45-50° C.

1.6. Desparafinación

- Xileno puro 10 min
- Xileno puro "
- Xileno + Alcohol 100% 5 min
- Etanol 100% 3 "
- Etanol 95% "
- Etanol 70% "

1.7. Coloración cuadruple

- Safranina al 2% 30 min
- Agua destilada (tres enjuagues)
- Cristal violeta 1% 90 seg
- Etanol 100% (tres enjuagues)
- Orange G (en aceite de clavo)
- + Fast Green 2 min
- Orange G (en aceite de clavo) 2 "

- Orange G (en aceite de clavo) 2 "
- Orange G " 2 "
- Xileno + Etanol 5 "

- Xileno 10 "
- Xileno 10 "
- Colocar cubreobjetos con Permunt

2. Cortes en resina

2.1. Fijación

Las muestras fueron fijadas en glutaraldehido al 2.5%.

2.2. Deshidratación

- Etanol al 50% 1 hr
- Etanol al 70% "
- Etanol al 80% "
- Etanol al 90% "
- Etanol al 100% "

2.3. Impregnación

- 50 ml de resina + 0,5 g de activador

2.4. Inclusión

- 15 ml de solución de impregnación + 1 ml de endurecedor

- Polimerizar a temperatura ambiente

2.5. Cortes en ultramicrotomo para resina

- Se hacen cortes de 1-2 μm de grosor

- Los cortes se colocan en cubreobjetos con agua destilada.

2.6. Coloración

- Colorear durante 1-2 min con azul de toluidina al 1%.

- Lavar el colorante con agua destilada

- Secar a temperatura ambiente

3. Colorantes

3.1. Safranina al 2%

Disolver 2 g de safranina en 100 ml de etanol 50%

3.2. Violeta Cristal al 1%

Disolver 1 g de violeta cristal en 100 ml de agua destilada

3.3. Orange "G"

9 partes de aceite de clavo saturadas de Orange G

1 parte de Fast Green al 1% en alcohol absoluto

Anexo 5A. LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
BA	6-bencilaminopurina
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxi-acético
AG	ácido giberélico
AlA	ácido 3-indol-acético
Zip	6-(dimetilamino) purina (2-isopentenil-adenina)
ANA	ácido naftaleno-acético
Pi	Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-triclorofenoxi-acético).
FAA	Formalina, alcohol, ácido acético (1:8:1)