



Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

**DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y SU EMPLEO EN
LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA POR BIOBALÍSTICA EN EL
CULTIVAR HÍBRIDO DE PLÁTANO ‘FHIA-21’ (*Musa* sp. AAAB)**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

DION DESMOND DANIELS

***Santa Clara, CUBA
2003***

SÍNTESIS

La transformación genética es una metodología para obtener nuevos clones en un período de tiempo relativamente corto, sin embargo, su éxito depende en gran medida de la disponibilidad de un sistema eficiente para la regeneración de plantas y de la efectividad de las construcciones genéticas. El primer objetivo general del presente trabajo fue desarrollar un esquema para la embriogénesis somática en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB). Se empleó este esquema para desarrollar el segundo objetivo general: la transformación genética mediante una pistola de genes de baja presión con el gas argón en el mismo cultivar híbrido de plátano. Los resultados demostraron que fue posible establecer suspensiones celulares embriogénicas a partir de embriones somáticos obtenidos de callos formados de flores masculinas inmaduras. A una densidad celular de 20% de volumen de células sedimentadas y con el medio de cultivo M3a, se formó el mayor número de embriones somáticos a partir de las suspensiones celulares. Otros resultados alcanzados en este trabajo revelaron que los embriones somáticos necesitaban ser transferidos a un medio de cultivo para su maduración durante un período de 20 días para mejorar los porcentajes de germinación. No obstante, los embriones somáticos formados al 15% de volumen de células sedimentadas y con 20 a 30 días en el medio de maduración lograron los mejores resultados en cuanto a la germinación. Para lograr la expresión transitoria del gen *uidA*, se ajustaron algunos parámetros que influyen en la transformación genética por biobalística. La mejor combinación de presión y distancia de bombardeo fue de 140 psi y 12 cm respectivamente, así con el recubrimiento de las micropartículas propuesto por Sanford *et al.* (1993). Los plásmidos conducidos por el promotor poliubiquitina del maíz lograron mayores niveles de expresión del gen *uidA*. El aumento de la cantidad de micropartículas no influyó en los resultados, pero al realizar dos disparos sobre el mismo blanco biológico se produjo una caída significativa en la expresión transitoria del *uidA*. En cuanto al parámetro biológico, los mejores resultados se alcanzaron cuando se utilizaron células embriogénicas recolectadas a los 5 días y a los 10 días después del último subcultivo. La mínima concentración inhibitoria del herbicida BASTA sobre los agregados celulares fue de 6.0 mg.L⁻¹.



1. INTRODUCCIÓN.

En un mundo donde el crecimiento poblacional está superando la producción de alimentos, la agricultura y especialmente la biotecnología vegetal, necesitan ser implementadas rápidamente en diversos aspectos de la vida (Sasson, 2001).

El plátano (*Musa spp.*) está entre los cultivos más importantes en los países del trópico y el subtropical. Junto a los bananos, ocupan el cuarto lugar en importancia a escala mundial después del arroz, el trigo y el maíz. La producción mundial de plátano en el año 2001 fue de 30.5 millones de toneladas, de las cuales el 74.2% se produjo en África, el 22.5% en América Latina y el 3.3% en Asia (FAO, 2002).

En Cuba, los plátanos viandas (AAB) constituyen un renglón estratégico de elevada prioridad dentro del programa alimentario nacional debido a su capacidad de producir todos los meses del año, su elevado potencial, arraigados hábitos de consumo y diversidad de usos (Rodríguez, 2000). Antes de 1990, más del 50% del área total plantada en Cuba era de plátano vianda. Con la entrada de la enfermedad Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), en noviembre de 1990, estas áreas se redujeron considerablemente (Pérez y Orellana, 1994). Es por ello que la introducción de nuevos genotipos resistentes a plagas y enfermedades constituye una prioridad, junto con el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* que permitan aumentar de forma rápida las poblaciones en campo.

La regeneración de plantas vía organogénesis a partir del cultivo de ápices se mantiene como el método de micropropagación más utilizado en este cultivo. Sin embargo, la embriogénesis somática ofrece posibilidades de obtener volúmenes de producción superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual la convierte en un método potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Torpe, 1991). Los estudios



relacionados con la embriogénesis somática se iniciaron a principios de los años 60, no obstante su empleo para la propagación comercial aún es escaso.

El mejoramiento genético en el género *Musa*, por medio de métodos tradicionales, se ha visto obstaculizado por varios factores, entre ellos: la baja fertilidad, la esterilidad, los niveles de ploidía y la falta de variabilidad genética que muestran sus especies (May *et al.*, 1995), además del tiempo que se necesita para obtener clones mejorados por esta vía.

La transformación genética es una metodología para obtener nuevos clones en un período de tiempo relativamente corto. Una de las ventajas de esta estrategia sobre el mejoramiento convencional se encuentra en la disponibilidad de fuentes de variabilidad genética. Mientras que los mejoradores convencionales están limitados a genes que existen en especies compatibles sexualmente, esta barrera no existe para la transformación genética (May *et al.*, 1995).

El primer reporte sobre plantas transgénicas que expresaron genes foráneos apareció a principios de la década de los 80 (Herrera-Estrella, 1983). Desde entonces, se ha logrado un gran progreso en el entendimiento de la transferencia de genes a células de plantas. Sanford *et al.* (1987) demostraron que las células de cebolla podían sobrevivir a la penetración de micropartículas, durante la cual el ácido desoxirribonucleico (ADN) podría ser transferido a estas células vivas. Un año después, Klein *et al.* (1988b) lograron las primeras plantas transgénicas de maíz con el gen de selección *nptII*.

Sági *et al.* (1995) demostraron que se puede transformar genéticamente vía biobalística *Musa* spp. con buenos resultados utilizándose suspensiones celulares de diferentes genotipos, pero la eficiencia de transformación fue influenciada por el genotipo y/o las características de la suspensión celular. Durante los últimos 10 años, la mayoría de los trabajos sobre la transformación genética en *Musa* spp. fueron sobre banano, específicamente el subgrupo



Cavendish, sin embargo, son muy limitados los trabajos realizados en el plátano y hasta la actualidad no se han reportado protocolos para la transformación genética en plátanos tetraploides.

El éxito de la transformación genética depende en gran medida de la disponibilidad de un sistema eficiente para la regeneración de plantas. La regeneración puede ser de origen unicelular o multicelular. El segundo caso, el más común en la regeneración vía organogénesis, trae consigo la formación de plantas quiméricas, las cuales constituyen un estorbo en cualquier proceso de mejoramiento genético (Pérez *et al.*, 1998). Para la transformación genética el modelo ideal sería sobre células aisladas cultivadas en suspensión y la posterior regeneración vía embriogénesis somática, con la cual se evitaría este inconveniente (Jiménez, 1998).

Aún existen limitaciones para el establecimiento de tales protocolos de regeneración en la mayoría de los cultivos, de ahí que se valoran otras alternativas que puedan minimizar la aparición de quimeras, tal es el caso de la embriogénesis repetitiva (Parrot *et al.*, 1991). Las limitaciones de la embriogénesis somática en el género *Musa* incluyen la baja producción de callos con estructuras embriogénicas, la imposibilidad de establecer suspensiones celulares embriogénicas en algunos cultivares y el bajo porcentaje de germinación y conversión de los embriones somáticos (Schoofs, 1997).

El cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (AAAB) ha ganado en popularidad en Cuba y varios países de América Latina debido a sus características agronómicas y organolépticas. No obstante, puede ser mejorado en algunos aspectos como: 1) la disminución del porte, ya que es un híbrido con altura entre 3.5-4.0 m (FHIA, 2002), la cual lo hace susceptible a fuerte vientos; 2) la resistencia a algunas enfermedades como la Sigatoka Negra, que a pesar de reportarse altamente resistente en Centro América (FHIA, 2002), en Cuba sufre de afectaciones por esta enfermedad (Bermúdez, 2000); 3) el retardo de la maduración es otra característica a



considerar para la transformación genética, por ser un fruto que se consume principalmente en estado verde.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: **Es posible desarrollar la embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' y emplearla en la transformación genética mediante el empleo de una pistola de genes.**

Para dar cumplimiento a esta hipótesis, en el presente trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

1. Obtener callos con estructuras embriogénicas formados a partir de las flores masculinas inmaduras del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB) y de estos, establecer suspensiones celulares.
2. Definir las condiciones de cultivo para la formación, maduración, germinación y conversión en plantas de los embriones somáticos, obtenidos a partir de las suspensiones celulares embriogénicas.
3. Ajustar los parámetros para la transformación genética de agregados celulares embriogénicos con una pistola de genes de baja presión.
4. Determinar la mínima concentración inhibitoria para la selección con el herbicida BASTA en los agregados celulares.

Novedad científica: Se desarrolló un esquema para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática, a partir de callos con estructuras embriogénicas formados de las flores masculinas inmaduras del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB). Se determinaron los parámetros más importantes para la transformación genética de agregados celulares embriogénicos vía pistola de genes de baja presión y con el empleo del argón como el gas propulsor. Estos resultados no han sido descritos hasta el momento en la literatura nacional e internacional para este cultivar híbrido de plátano.



Importancia teórica: Con los resultados alcanzados en este trabajo se realiza un aporte al conocimiento de la embriogénesis somática en general y particularmente en los plátanos. También se establecen los factores, tanto físicos como biológicos en la transformación genética vía pistola de genes de baja presión empleando como gas propulsor el argón, para el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

Importancia práctica: Se cuenta con un protocolo de transformación genética vía biobalística que utiliza argón como gas propulsor que permite el mejoramiento genético en este cultivo. El desarrollo de una metodología de regeneración de plantas vía embriogénesis somática puede ser una vía alternativa para la propagación del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (AAAB).



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. ORIGEN.

El centro de origen del género *Musa* es el sureste de Asia, extendiéndose desde La India hasta Papua, Nueva Guinea e incluyendo a Malasia e Indonesia. En esta región aún existe un gran número de variedades silvestres con semilla. La historia de las variedades de plátanos y bananos está vinculada al movimiento temprano de la población humana. Se piensa que la domesticación surgió en esta región como resultado de mutaciones en las especies silvestres obteniéndose una producción de plantas con frutos comestibles y sin semillas. Los diploides (AA) y triploides (AAA) de *Musa acuminata* fueron llevados por el hombre a áreas donde *Musa balbisiana* es nativo y las hibridaciones naturales resultaron en la formación de progenies con los genomas AB, AAB y ABB (Simmonds, 1962).

Aunque se señala que los portugueses fueron los primeros en introducir los plátanos y bananos en América, el origen de estos cultivos en el nuevo mundo aún queda como tema de discusión. Se piensa que los plátanos y bananos fueron llevados desde África hasta Las Islas Canarias alrededor de 1400 y de allí Friar Tomas Berlanga introdujo un clon no identificado en Santo Domingo, República Dominicana, en 1516 (Simmonds, 1966). Esta es considerada la primera de muchas más introducciones durante los años.

2.2. TAXONOMÍA.

Los plátanos son plantas herbáceas, con un falso tallo de forma cilíndrica formado por las vainas de las hojas superpuestas, un cormo y un sistema radical fibroso (López, 1989). Son miembros del género *Musa*, el cual es parte de la familia *Musaceae*. La familia *Musaceae* contiene dos géneros, *Musa* y *Ensete*.



El género *Ensete* probablemente se originó en Asia y se dispersó primeramente por África. La especie más importante es *E. ventricosum* (Welw) Cheesm, cultivo básico alimentario en partes del sur de Etiopía.

El género *Musa* está dividido en cuatro secciones: *Callimusa*, *Australimusa*, *Eumusa* y *Rhodochlamys*. Las especies en las secciones *Callimusa* y *Rhodochlamys* son de interés ornamental ya que no producen fruto comestible.

La sección *Australimusa* contiene *Musa textilis* (Abaca), cultivado particularmente en Filipinas para la producción de “Manila hemp”. Esta especie rinde una fibra fuerte, la cual es utilizada en la manufactura de sogas marinas y en la industria pesquera, pues la misma es resistente a la humedad y al agua salada.

Virtualmente todas las variedades cultivadas de plátanos y bananos han surgido de *Eumusa*. Esta sección es la más grande del género y la más dispersa geográficamente. La misma contiene alrededor de 11 especies, pero la mayoría de los cultivares son derivados de solo dos, *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B).

2.3. IMPORTANCIA.

Como alimento para los humanos, los plátanos pueden ser consumidos hervidos, fritos o tostados (INIBAP, 1998). El fruto del plátano es altamente energético y sus carbohidratos son fácilmente asimilables. Es rico en vitaminas A, B, C, E y en minerales. Por el contenido de vitamina A, los plátanos pueden ayudar en la digestión. El jugo de las flores masculinas suministra un remedio para problemas estomacales en personas de todas las edades. En tanto, hay reportes que el fruto maduro se usa en tratamientos de asma y bronquitis. Su importancia medicinal hace que sirva para muchas otras cosas (Thompson, 1995).



El uso del plátano para preparar bebidas alcohólicas está muy generalizado en los países tropicales. En el centro y este de África, el jugo del fruto maduro de variedades conocidas como *beer banana*, se puede tomar fresco o para elaborar cerveza con bajo contenido de alcohol. La cerveza es importante desde el punto de vista nutricional porque es rica en vitamina B debido al contenido de levadura. En Uganda y Sudan, los bananos de estas variedades son destilados para producir alcohol de banano o *waragi* (INIBAP, 1998).

2.4. SITUACIÓN EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE.

Alrededor del 70% de los plátanos y bananos producidos en América Latina y el Caribe son consumidos localmente, y los plátanos en particular (*Musa spp. AAB*) juegan un papel muy importante en la seguridad de la alimentación en la región. Según la Corporación Colombia Internacional el consumo fresco para el año 1999 se estimó en 62 Kg/persona/año, uno de los más altos del mundo. Por esta región, los pequeños negocios producen un amplio rango de productos procesados de plátanos, los cuales suministran una fuente adicional de empleo e ingreso muy importante.

La región es bien conocida como productora de plátano. Colombia aporta 39.1% de la producción de América Latina y el Caribe y en el ámbito mundial participa con 8.8%, con un comportamiento relativamente estable en los últimos ocho años. Le sigue Perú que participa con 4.4% en la producción del mundo y con 19.5% en América Latina y el Caribe (Rodríguez y Rodríguez, 2001). La industria de bananos para la exportación es la columna vertebral de las economías de muchos países caribeños. En algunas de las islas pequeñas del Caribe, el cultivo representa hasta el 90% de las exportaciones primarias, el 70% del intercambio de moneda extranjera y el 60% del empleo en la agricultura (INIBAP, 1998).



En Cuba, una nueva fase de desarrollo del cultivo se inicia con el empleo en las plantaciones de material propagado *in vitro* y el uso del riego localizado, reemplazándose algunos clones establecidos por otros resistentes a enfermedades como el Burro CEMSA (ABB) y Pelipita (ABB). En la última década Cuba ha introducido algunos cultivares híbridos de plátanos procedentes de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) dentro de los cuales se encuentran los FHIA-21, FHIA-20 y FHIA-22 (Bermúdez, 2000).

2.5. CULTIVAR HÍBRIDO DE PLÁTANO 'FHIA-21' (*Musa sp.* AAAB).

Durante las últimas décadas, La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) ha trabajado en el mejoramiento genético del género *Musa*. Uno de los cultivares híbridos desarrollado por esta fundación es el 'FHIA-21', cuya ficha descriptiva aparece a continuación (FHIA, 2002):

- ⇒ Nombre de la variedad: FHIA-21
- ⇒ Origen: FHIA, Honduras, Centro América
- ⇒ Nombre del mejorador: Phillip Rowe
- ⇒ Tipo: Plátano tipo Francés
- ⇒ Año de generación: 1987
- ⇒ Nombre código: FHIA SH-3460
- ⇒ Linaje: AVP-67 (AAB) X SH-3142 (AA)
- ⇒ Genoma/Ploidía: AAAB
- ⇒ Uso: Consumo procesado (hervido o frito, verde o maduro)

Características de la planta:

Morfológicas:

- Hábito foliar: decumbente
- Apariencia del seudotallo: brillante (no ceroso)
- Altura: 3.5-4.0 m
- Tipo de bellota: normal (presente permanentemente)
- Forma de racimo: asimétrico
- Posición del racimo: ligeramente inclinado



- Color de fruto: verde claro
- Forma de fruto: recto en la parte distal
- Forma ápice del fruto: ligeramente puntiagudo

Fenológicas:

- Duración primer ciclo vegetativo (siembra a floración): 240-280 días
- Duración primer ciclo productivo (parición a cosecha): 85-100 días
- Días transcurridos de siembra a segunda floración: 540-570 días

Producción:

- Peso neto (sin raquis) de racimo: 22-27 kg
- Número de dedos por racimo (sin desmane): 120-150 dedos
- Número de dedos/racimo (con desmane a 5 manos): 70-80 dedos
- Peso dedos individuales (con desmane a 5 manos): 250-350 g

Reacción a enfermedades:

- Sigatoka negra: Altamente resistente
- Mal de Panamá: Resistente
- Nemátodos: Susceptible a *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffea*
- Pudrición de corona: Desconocida

Descripción del sitio de evaluación:

- Localización: Latitud N15° 2131 Longitud O 87° 5635
- Precipitación Pluvial Anual: 1000 a 1200 mm
- Temperatura Promedio Anual: 26°C
- Altura Promedio: 25 msnm

2.6. LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

2.6.1. CONCEPTO Y ORIGEN.

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Merkle *et al.*, 1995). Normalmente, los tejidos inoculados *in vitro* tienen que ser expuestos a reguladores del crecimiento y otros factores de estrés para la inducción de la embriogénesis somática.



Pioneros de la embriogénesis somática *in vitro* fueron Levine (1950), Wiggans (1954) y Steward *et al.* (1958). Ellos describieron la formación de yemas y estructuras proembriogénicas en *Daucus carota* después de disminuir las concentraciones de auxinas iniciales en el medio de cultivo. También fueron los primeros en demostrar la totipotencia en células somáticas de plantas.

Halperin (1966) introdujo el término de masas proembriogénicas para describir las masas celulares embriogénicas, de las cuales los embriones somáticos pueden formarse.

La embriogénesis somática ha sido descrita para un amplio número de plantas (Schoofs, 1997), sin embargo, la inducción de embriones somáticos y la regeneración de plantas aún no es rutina, ni eficiente para la mayoría de las especies. Merkle *et al.* (1995) plantearon que mientras más cerca llega el patrón de la expresión génica del embrión somático al de embrión cigótico, más alta será la posibilidad de obtener un sistema de regeneración altamente eficiente.

2.6.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

La embriogénesis puede ser considerada como un caso extremo de plasticidad fenotípica, donde varios estados de desarrollo pueden ser alterados en las condiciones apropiadas (Dudits *et al.*, 1995). Schoofs (1997) planteó que al alterar las condiciones de crecimiento y someter los tejidos u órganos inoculados a condiciones no usuales, la planta puede anular o alterar la expresión del gen relacionado a una función específica presente en la planta y que sea competente a las señales inductivas para la embriogénesis somática. Todas las células somáticas dentro de una planta contienen el conjunto completo de información genética para regenerar una planta completa y funcional (Merkle *et al.*, 1995).

Células que son embriogénicas o están no muy lejos de ese estado, son inducidas más fácilmente para pasar por el proceso de embriogénesis somática. Tales células fueron



denominadas *células somáticas determinadas preembriogénicamente* (Evans *et al.*, 1981; Sharp *et al.*, 1982).

Al contrario de la embriogénesis directa de células somáticas determinadas preembriogénicamente, las células vegetales, altamente diferenciadas, requieren mayores estímulos para inducir el estado embriogénico. Reguladores del crecimiento y/u otros factores de estrés son requeridos para inducir la desdiferenciación y la división celular. Estas células son denominadas *células somáticas no embriogénicas*. La inducción de la embriogénesis somática de estas células es indirecta porque está involucrada una fase intermedia de callo. El éxito de la embriogénesis depende entonces de la “distancia” epigenética que tienen las células en el explante, del estado embriogénico (Merkle *et al.*, 1995). El origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos está relacionado con la madurez de la célula o la distancia epigenética del estado embriogénico en explantes multicelulares (Williams y Maheswaran, 1986).

2.6.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

2.6.3.1. Genotipo.

Asumiendo que la inducción de la embriogénesis somática posiblemente involucra la activación de la misma ruta genética que la embriogénesis cigótica, la embriogénesis somática debe ser un fenómeno universal para todas las plantas que producen semillas. No obstante, genotipos individuales dentro de una especie pueden variar grandemente en su capacidad embriogénica. Tales diferencias de genotipo pueden deberse a la habilidad para activar elementos fundamentales en la ruta embriogénica (Merkle *et al.*, 1995).

Varios autores han reportado sobre la dependencia del genotipo (Ivanova *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 1995; Jeannin *et al.*, 1995). Las respuestas embriogénicas también pueden variar entre cultivares o entre individuos de un cultivar dado (Feirer y Simon, 1991).



Schoofs (1997) planteó que la facilidad con que se puede romper la dominancia apical de proliferaciones *in vitro* en el género *Musa* estaba correlacionada al porcentaje del cromosoma B en el genoma del cultivar. Dhed'a (1992) logró establecer suspensiones celulares de cinco cultivares, todos los cuales contienen por lo menos un conjunto de cromosoma B en su genoma. Como tal, puede concluirse que la inducción exitosa de la embriogénesis somática en el género *Musa* parece estar muy relacionada a la composición del genoma.

2.6.3.2. Explante.

La selección del explante puede ser un factor fundamental que determina el fracaso o el éxito de un protocolo embriogénico (Brown *et al.*, 1995; Krishnaraj y Vasil, 1995). El explante más común para monocotiledóneas y dicotiledóneas es el embrión cigótico inmaduro, aunque, en las monocotiledóneas las células se diferencian rápidamente y pierden su totipotencia. La presencia de tejidos maduros y más diferenciados inhibe la expresión de la competencia embriogénica en las células (Vasil, 1987).

Para células y tejidos determinados preembriogénicamente, el uso solo de citoquinina puede ser suficiente para inducir la embriogénesis somática, mientras que para células no embriogénicas o más diferenciadas, es necesaria una auxina o una auxina en combinación con una citoquinina (Schoofs, 1997).

La selección del mejor explante puede variar de especie a especie. No sólo el tipo de explante, sino también la edad, el estado de desarrollo y el nivel de diferenciación, parecen influenciar en la respuesta embriogénica. Ivanova *et al.* (1994) encontraron que los explantes de hojas en *Medicago falcata* son mejores cuando se toman de plantas con 30 días de edad, ya que en etapas más tardías los niveles de ácido indolacético (AIA) endógenos disminuyen



significativamente. Altos niveles de AIA endógenos están correlacionados con una respuesta embriogénica rápida.

2.6.3.3. Reguladores del crecimiento.

Las auxinas, especialmente la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), son los inductores más eficientes del potencial embriogénico (Ammirato, 1983). El 2,4-D es la auxina más común aplicada para inducir la embriogénesis somática. El éxito de las auxinas sintéticas, como el 2,4-D en la inducción de la embriogénesis somática, ha sido atribuido a la potencia de estas auxinas (Schoofs, 1997).

La concentración de auxina y el tipo necesarios para inducir la embriogénesis somática depende altamente de la especie y el tipo de explante. En general, las monocotiledóneas y especialmente las Poaceae, necesitan auxinas fuertes a altas concentraciones a diferencia de especies dicotiledóneas (Vasil, 1985). La inducción de la embriogénesis somática por las auxinas es un proceso dependiente de la concentración (Schoofs, 1997), sin embargo, De Vries *et al.* (1988) encontraron que por encima de una concentración umbral, el desarrollo del potencial embriogénico fue independiente de la concentración del 2,4-D.

Alizadeh y Mantell (1991) describieron el proceso de activación y cambios metabólicos tempranos generados por el 2,4-D en células perivasculares de *Solanum aviculare*. En este estudio el citoplasma se tornó más denso y posteriormente las divisiones mitóticas en estas células condujeron a la formación de agregados embriogénicos con núcleo central prominente. Estos mismos autores plantearon que en presencia de 2,4-D, las células en división activa aumentan su contenido citoplasmático y el número de organelos, estos último con mejor desarrollo. También se observó la acumulación de almidón.



El nivel de auxina necesario para mantener la embriogénesis repetitiva o secundaria, varía entre especies. En zanahoria (*Daucus carota* L.), mijo (*Panicum miliaceum*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y *Musa* spp, las suspensiones celulares embriogénicas son mantenidas a concentraciones relativamente altas de auxina (Sato *et al.*, 1986; Nayak y Sen, 1989; Kiyosue *et al.*, 1991; Dhed'a *et al.*, 1991).

2.6.3.4. Condiciones de cultivo.

Las condiciones de temperatura e intensidad luminosa óptimas, ciertamente varían de especie a especie. McCain *et al.* (1988) indujeron callos embriogénicos friables a partir de embriones inmaduros de maíz (*Zea mays*) en la oscuridad. Inflorescencias inmaduras fueron cultivadas en la oscuridad o a bajas intensidades luminosas en *Phoenix dactylifera* (Bhaskaran y Smith, 1992). Lazzerri *et al.* (1987) plantearon que los tubos fluorescentes Grolux®, que suministran más luz en el espectro rojo, pueden promover la formación de callos embriogénicos en soja (*Glycine max*).

2.6.4. ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

2.6.4.1. Inducción de la embriogénesis somática.

La inducción de la embriogénesis somática no siempre es segura, aun con explantes idóneos, extirpados de plantas desarrollándose bajo condiciones óptimas y colocados en medio de inducción adecuado, con las concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento correctas (Schoofs, 1997). Mientras que las auxinas pueden inducir respuestas embriogénicas en tejidos maduros de plantas dicotiledóneas, la embriogénesis somática en plantas monocotiledóneas solo puede ser inducida desde células meristemáticas y células diferenciadas parcialmente (Krishnaraj y Vasil, 1995).



2.6.4.2. Establecimiento y mantenimiento de células en suspensión.

En la mayoría de los cultivos se emplean, como material de partida para el establecimiento de suspensiones celulares, callos con embriogénesis somática de alta frecuencia y/o embriones somáticos obtenidos, pero en etapas iniciales de desarrollo (Gómez, 1998). También puede lograrse a partir de: tallos, hojas, secciones de hipocótilos, pétalos, meristemas apicales, ovarios, embriones cigóticos, tubérculos, filamentos de anteras y fragmentos de cotiledones (Dennis *et al.*, 1993).

Además de las células embriogénicas, muy frecuentemente se encuentran células no embriogénicas en las suspensiones celulares (Dhed'a *et al.*, 1991). Nayak y Sen (1989) describieron las células de suspensiones de mijo que son ricas en almidón, como parcialmente embriogénicas, las cuales aún pueden ser transformadas en células embriogénicas bajo condiciones adecuadas. Estos autores encontraron también que tanto el intervalo de subcultivo como la temperatura de incubación, influyen en la frecuencia relativa de células embriogénicas.

Cuando las suspensiones celulares embriogénicas no son subcultivadas frecuentemente, la suspensión se torna mucilaginoso (Vasil y Vasil, 1982). Estas mismas observaciones fueron hechas en suspensiones celulares de *Musa* (Panis, 1995). Al llegar al tiempo de cultivo, estas pierden sus características embriogénicas, el color de la suspensión celular cambia, y las células son menos densas. Estudios histológicos revelaron la acumulación de almidón y vacuolación en células más viejas. Para evitar esto, el medio debe ser cambiado antes de llegar al fin de la fase exponencial de la curva de crecimiento (Schoofs, 1997). También la densidad celular tiene un impacto sobre la proliferación celular y el mantenimiento de las características embriogénicas. Los mejores resultados fueron obtenidos al ajustar la concentración de la suspensión a 1/3 de la densidad inicial.



Toonen *et al.* (1994) señalan que densidades celulares hasta 10 000 células/mL en zanahoria, son necesarias para inducir las divisiones celulares. Ho y Vasil (1983) hacen referencia a métodos de subcultivo que afectan la tasa de crecimiento de las células y la densidad de grupos de éstas en cultivos de la caña de azúcar.

2.6.4.3. Formación de embriones somáticos.

Para inducir la formación de embriones a partir de masas proembriónicas, las células embriónicas pueden ser transferidas a un medio de cultivo con concentración de auxina más baja (Ho y Vasil, 1983), con menos auxinas activas (Hepher *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1993) o desprovisto de auxinas (Choudhary y Chin, 1995; Amarasinghe *et al.*, 1996).

Frecuentemente, los cultivos de células también son diluidos al ser transferidos al medio de cultivo para la inducción de embriones (Jansen *et al.*, 1990; Sterk *et al.*, 1991). Sung y Okimoto (1981) encontraron que la dilución y la eliminación de auxina son necesarias para el desarrollo normal del embrión.

Las auxinas (a concentraciones más altas) no bloquean la formación temprana del embrión, ya que la embriogénesis directa ocurre en la presencia de auxinas. La auxina, sin embargo, bloquea el desarrollo del embrión más allá de cierta etapa y frecuentemente evita la transición de la etapa globular a corazón (Schoofs, 1997).

2.6.4.4. Germinación y conversión de los embriones somáticos en plantas.

La germinación es muy importante en el proceso de la embriogénesis somática y es diferente de la conversión. La germinación se refiere al desarrollo de la raíz y/o brote, mientras que la conversión se define por Stuart y Strickland (1984) como la supervivencia y desarrollo en fase de propágulo en condiciones ambientales *ex vitro*, o sea, en suelo. La habilidad de obtener *in*



vitro plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Fuji *et al.*, 1990).

2.6.5. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN LOS PLÁTANOS Y BANANOS.

El explante inicial más utilizado para la embriogénesis somática en *Musa* spp. ha sido la flor masculina inmadura (Ma, 1991; Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 1996a). Marroquín *et al.* (1993) lograron la regeneración de suspensiones embriogénicas con el empleo de embriones cigóticos jóvenes, pero este procedimiento está limitado a las especies seminíferas. Dhed'a (1992) y Schoofs (1997) establecieron suspensiones celulares de *scalp*, definido como la parte meristemática entre 4-6 mm de pequeños meristemas blancos; estos también se denominan multiyemas. Grapin *et al.* (1998) realizaron estudios sobre el uso de las flores femeninas. Este método, sin embargo, conlleva a la pérdida del racimo y la planta, por lo tanto, es difícil su aplicación en gran escala.

Todos los explantes somáticos empiezan por producir glóbulos meristemáticos, también denominados callos nodulares. Estos glóbulos meristemáticos no son embriogénicos, sin embargo, pueden desarrollar estructuras embriogénicas (Dhed'a *et al.*, 1991; Dhed'a, 1992) o formar un callo blanco traslúcido, del cual se desarrollan los embriones somáticos después de un tiempo de cultivo prolongado (Escalant *et al.*, 1994).

Côte *et al.* (1996) plantearon que después de cultivar flores masculinas de 'Gran Enano' (AAA) durante 5-6 meses, fueron obtenidos callos amarillos compactos y tejidos embriogénicos friables con numerosos embriones. Para este mismo cultivar, Escalant *et al.* (1994) plantearon que la respuesta embriogénica de las flores masculinas nunca excedió el 5%. Navarro *et al.* (1997) lograron la formación de callos amarillos compactos del 50% de los explantes establecidos, aunque, solo del 2 al 6% del número inicial de explantes dio origen al callo blanco embriogénico. La respuesta de los tipos Cavendish es muy variable y usualmente menor de 1%



cuando se usa *scalp* como explante (Schoofs *et al.*, 1999). Grapin *et al.* (1998) obtuvieron valores de 1.9% y 2.9% en 'Curaré Enano' (AAB) y 'Curaré' (AAB) respectivamente, al usar flores femeninas como explantes.

Después de 2 ó 3 meses se formaron callos nodulares amarillos más frecuentemente en las yemas florales con posiciones de 4 a 12. La necrosis ocurrió en las flores más jóvenes, donde las posiciones de 13 a 14 continuaron su desarrollo (Grapin *et al.*, 1996a). Por otra parte, Escalant *et al.* (1994) obtuvieron el 74% de las respuestas embriogénicas distribuidas entre las posiciones de 7 a 13. Resultados similares alcanzó Bieberach (1995) al obtener respuestas embriogénicas entre posiciones de 8 y 13 en cultivares de 'Gros Michel' (AAA), 'Gran Enano' (AAA), 'EMBRAPA-403' (AAAB) y 'Dominico' (AAB).

Hay numerosos resultados sobre la suspensión celular embriogénica y la subsiguiente regeneración de plantas, pero solo en pocas especies se han realizado estudios histológicos sobre células embriogénicas (Dhed'a *et al.*, 1991; Panis, 1995; Côte *et al.*, 1996; Grapin *et al.*, 1996a).

Algunas células periféricas en agregados embriogénicos de *Musa*, pueden ser ricas en almidón, sin embargo, la acumulación de almidón en estas células puede estar vinculada a la diferenciación celular y la pérdida de la potencia embriogénica; como tal, las células que aumentan el contenido de la vacuola, adquieren una forma más esférica y tienden a ser aisladas (Panis, 1995; Côte *et al.*, 1996). Panis (1995) encontró que la acumulación de almidón y el contenido de la vacuola aumentan en la mayoría de las células embriogénicas en la fase post-exponencial de las suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp.

Marroquín *et al.* (1993) plantearon que numerosas células se liberaron en el medio líquido para formar una suspensión en *Musa acuminata*. La observación microscópica mostró muchas



células aisladas con características embriogénicas: citoplasma denso, gran núcleo central con grandes nucleolos, grandes cantidades de proteína de reserva y algunos granos de almidón (Williams y Maheswaran, 1986). Estas suspensiones también contenían muchos agregados pequeños de células embriogénicas (2 a 5 células) y pocas células elongadas.

Côte *et al.* (1996) lograron establecer suspensiones celulares en el cultivar 'Gran Enano' (AAA), las cuales tenían una composición heterogénea y se mantuvieron en medio de cultivo líquido por más de 16 meses. Resultados similares lograron Gómez *et al.* (1999) en este cultivar.

Côte *et al.* (1996) plantearon que los primeros embriones fueron discernibles entre los 20 y 30 días después que la suspensión fue plaqueada sobre el medio de cultivo. Después de 80 días, el número promedio de embriones formados por mililitro fue $370 \times 10^3 \pm 65 \times 10^3$. Novak *et al.* (1989) revelaron cantidades de $20-30 \times 10^3$ en suspensiones de cultivares de bananos diploides y triploides obtenidos de cultivos de rizomas. Grapin *et al.* (1996a) demostraron que fue posible obtener 300 embriones de un agregado de aproximadamente 500 μm de diámetro.

Bieberach (1995) observó la formación de embriones somáticos a los cuatro meses de cultivo en 'Gran Enano' y a los seis meses de cultivo en 'Dominico' (AAB). El promedio de embriones somáticos diferenciados de 1.0 mL de suspensión celular, fue de 439 en medio de cultivo líquido y de 197 en el medio de cultivo semisólido. Mientras que Barranco (2000) obtuvo en el cultivar 'Gran Enano' los mejores resultados con una densidad celular de 15%, formándose 2561.5 ± 95.3 embriones somáticos en medio de cultivo líquido y 219.5 ± 9.0 en medio de cultivo semisólido a partir de 1.0 mL de células. Gómez *et al.* (2002), a partir de la misma cantidad de suspensión celular obtuvieron 1883 embriones somáticos en etapa globular después de 30 días de cultivo. Estos estudios se realizaron en medio de cultivo líquido en el cultivar híbrido 'FHIA-18' (AAAB).



El porcentaje de germinación en el cultivar 'Gran Enano' depende del tamaño de los embriones somáticos. Los que miden de 100 a 250 μm de longitud, lograron un porcentaje promedio de 3% y los que miden de 800 a 1000 μm , un 20% (Côte *et al.*, 1996). Dhed'a *et al.* (1991) señalaron porcentajes de germinación de 10 a 23% en el cultivar 'Bluggoe' (ABB) cultivado de meristemo, mientras que Novak *et al.* (1989) mencionaron de 1.5 a 12% en bananos y banano de cocción cultivados por rizomas. Marroquín *et al.* (1993) lograron porcentajes de germinación de 20 a 36% en *Musa acuminata*, mientras que Grapin *et al.* (1996a) obtuvieron en el plátano 'French Sombre' (AAB) porcentajes de germinación de 10 a 40%. Estos resultados son bajos en comparación con los que han logrado autores como Escalant *et al.* (1994) en diferentes cultivares y Navarro *et al.* (1997) en *Musa acuminata*, quienes obtuvieron entre 60 y 70% de germinación respectivamente. Todos estos resultados indican que el genotipo influye en el proceso de la germinación.

Barranco (2001) propuso una metodología para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en el cultivar híbrido 'FHIA-18' (*Musa* sp. AAAB). Este autor multiplica la suspensión celular con una densidad celular de un 3% de VCS y con 100 mg de masa fresca (mgMF) logró la formación de 1871 ± 9.32 embriones somáticos por litro. Con el empleo de medio de cultivo semisólido, Barranco (2001) obtuvo 40.6% de germinación, mientras que Cabrera (2001) en el cultivar 'Navolean' (*Musa* sp. AAB), logró 49.33%. Ambos autores lograron porcentajes mayores del 70% al usar medio de cultivo líquido.

Barranco (2001) logró 98.5% de conversión tanto en plantas procedentes de la organogénesis como de la embriogénesis somática en el cultivar híbrido 'FHIA-18'. Mientras que Cabrera (2001), en un estudio similar en el cultivar 'Navolean', obtuvo 95% de conversión.



2.7. MEJORAMIENTO GENÉTICO.

2.7.1. MEJORAMIENTO CONVENCIONAL.

El mejoramiento genético del género *Musa* empezó con un programa en el año 1922 en la región caribeña (Pérez, 2000). Durante los últimos años, la ocurrencia de enfermedades que afectan los plátanos, como la Sigatoka Negra y el Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*), ha aumentado significativamente. Es por ello que la obtención de nuevos genotipos resistentes se convierte en una prioridad (Marroquín *et al.*, 1993). No obstante, el mejoramiento genético en el género *Musa*, con el empleo de métodos tradicionales, se ha visto obstaculizado por varios factores, entre ellos: la baja fertilidad, la esterilidad, los niveles de ploidía y la falta de variabilidad genética que muestran sus especies (May *et al.*, 1995); además del tiempo que se necesita para obtener clones mejorados por esta vía. Grapin *et al.* (1996a) plantearon que los métodos tradicionales no cuentan con la facilidad de transferir características de resistencia a la planta. Con el mejoramiento genético por biotecnología se puede vencer estas limitaciones.

La FHIA liberó el tetraploide 'FHIA-01' o 'Goldfinger', el cual ha sido el candidato más promisorio de ser el primer híbrido del tipo fruta, desarrollado por método convencional y cultivado comercialmente (Rowe y Rosales, 1993). Otros híbridos desarrollados por la misma fundación y por método convencional incluyen FHIA-02, 03, 04, 05, 18, 19, 20, 21 y 22. Varios híbridos tetraploides de plátano han sido desarrollados por el Instituto Internacional de Agricultura Tropical con potencial para áreas devastadas por enfermedades en África tropical (Vuylsteke, 2001).

2.7.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.

La transformación genética de plantas puede ser definida como la introducción e integración estable de genes en el genoma de una planta y su expresión en la planta transgénica (Sági *et*



al., 1998). Ésta involucra la introducción de por lo menos dos genes (un gen marcador de selección y un gen de interés), pero el número de genes introducidos simultáneamente puede ser mucho más (Sági *et al.*, 1995b). Esta rama de la Ingeniería Genética no se restringe a organismos específicos, ya que el gen a transferir puede ser donado por plantas, bacterias, hongos y animales y ser incorporado a uno de ellos (Sanford *et al.*, 1993).

La transformación genética es utilizada para la manipulación genética de más de 120 especies de 35 familias, incluyendo algunos cultivos económicos como legumbres, ornamentales, medicinales, frutales y forestales (Kim *et al.*, 2001).

Muchas especies han sido transformadas genéticamente durante las últimas décadas, tal es el caso de las poaceae, monocotiledóneas, las cuales se consideraban recalcitrantes. Está claro que probablemente todos los tipos de células pueden ser transformadas por una de las dos técnicas, bombardeo de micropartículas o co-cultivación con *Agrobacterium tumefaciens*, pero todas las células no son capaces de regenerar plantas (de la Riva *et al.*, 1998).

Independientemente de qué técnica se utiliza, las condiciones precisas de transformación para un tipo de célula específica, requiere la optimización para cada especie y posiblemente para cada variedad (Birch, 1997). Un factor crítico en la transformación es la selección de las células transformadas, ya que los genes introducidos serán incorporados solo en una fracción de las células expuestas a la transformación. La selección se realiza con la ayuda de genes marcadores de selección que confieren resistencia a agentes químicos, tales como antibióticos, herbicidas, análogos de aminoácidos o azúcares (Sági *et al.*, 1998).

La transformación, sin embargo, tiene algunas limitaciones tales como los altos niveles variables de la expresión del transgen y la supresión completa (Birch, 1997). La expresión génica variable puede ser debido a una integración aleatoria del transgen en el genoma de la



planta. Por otra parte el silenciamiento del gen parece estar relacionado con copias múltiples del gen transferido y/o la metilación del ácido desoxiribonucleico (ADN), aunque el mecanismo preciso aún no está descrito (May *et al.*, 1995; Sági *et al.*, 1995b).

La transformación genética tiene varias aplicaciones en el mejoramiento genético de las plantas; la resistencia de las plantas contra los hongos patógenos es una de ellas, donde se pueden emplear varias estrategias. Una de las más importantes son los cambios en la composición de las fitoalexinas o transferencia de genes exógenos que codifican para fitoalexinas foráneas, las cuales pueden aumentar la inhibición del crecimiento fúngico (Hain *et al.*, 1990). Otra estrategia es el uso de varias proteínas con efectos antifúngicos; las más estudiadas son las quitinasas y β -1,3-glucanasas. Niveles apreciables de protección sólo podrán ser logrados con la combinación de varios genes (Jach *et al.*, 1995). La muerte celular artificial es otro tipo de protección que está basado en la expresión de genes que inducen la necrosis en el sitio de la infección, mediante la inhibición del crecimiento y la reproducción del hongo patógeno. Por esta vía se han obtenido plantas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con un incremento de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Martini *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1995).

Hasta el momento, la estrategia más frecuente para producir plantas resistentes a virus por Ingeniería Genética es la expresión del gen que codifica para la proteína de la cubierta de algunos virus (Beachy *et al.*, 1990), contándose con más de 20 especies transformadas por esta estrategia, entre ellas: la papa (Van der Wilk *et al.*, 1991), el arroz (*Oryza sativa*) (Hayakawa *et al.*, 1992), la papaya (*Carica papaya*) (Fitch *et al.*, 1992) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Willmitzer, 1993).

La resistencia al ataque por insectos puede lograrse a través de la expresión de genes que codifican para inhibidores de proteasas que interfieren en el metabolismo de los insectos o



mediante la vía más difundida: la expresión de genes provenientes de *Bacillus thuringiensis* (Gil *et al.*, 1998). Los resultados más notables han sido en tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Fischhoff *et al.*, 1987), tabaco (Molina *et al.*, 1991), papa (Chen *et al.*, 1992), maíz (*Zea mays*) (Hill *et al.*, 1995) y caña de azúcar (Arencibia *et al.*, 1997).

Se ha trabajado en dos líneas fundamentales para mejorar la calidad de los frutos: el retardo del proceso de la maduración mediante el bloqueo de la síntesis de etileno (Hamilton *et al.*, 1990; Arntzen, 1993) y el aumento de la resistencia de los frutos a los daños mecánicos, a través del bloqueo la actividad de la poligalacturonasa (Smith *et al.*, 1988). Plantas transgénicas de tomate con frutos menos sensibles a los daños mecánicos fueron reportados por Smith *et al.* (1990).

Otras aplicaciones de la Ingeniería Genética en el mejoramiento de plantas están dadas por el empleo de plantas transgénicas como biorreactores, con fines ornamentales y para limpiar de metales pesados los suelos contaminados (Gil *et al.*, 1998).

Los métodos de transformación genética se clasifican en directos e indirectos, atendiendo a la forma de introducción del ADN foráneo en la célula. El criterio para la selección y aplicación de uno de ellos depende en gran medida del material vegetal y de la capacidad regenerativa del mismo (Sági, 2000).

Los métodos indirectos aprovechan la capacidad de entes biológicos, que de forma natural infectan las plantas, transfiriendo parte de su ADN al genoma vegetal. El método indirecto más utilizado es la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, aunque se han empleado otras especies bacterianas como el *Agrobacterium rhizogenes* y en menor medida otros organismos como los virus (Pérez, 2000). Los métodos directos se caracterizan por la transferencia directa del ADN foráneo al genoma celular, sin la necesidad de organismos intermediarios. Dentro de este sistema de transferencia de genes se incluyen métodos como la



microinyección, la electroporación, los tratamientos químicos con polietilenglicol y el bombardeo de micropartículas o biobalística (Sanford *et al.*, 1993).

2.7.2.1. Transformación genética por biobalística.

La transformación genética por pistola de genes o biobalística fue reportada por Sanford *et al.* (1987) y se basa en la aceleración a altas velocidades de micropartículas generalmente de tungsteno u oro, recubiertas con ADN, las cuales pueden atravesar la pared y membranas celulares (Sági, 2000). Los mecanismos de aceleración de las partículas han sido muy diversos, empleándose descargas de gas comprimido, transmisión de impulsos mecánicos, macroproyectiles con placa de detención, sistemas de aceleración centrípeta y campos eléctricos (Sanford *et al.*, 1987).

Además de los equipos de bombardeo disponibles comercialmente, basados en una descarga eléctrica o presión de helio, se están manufacturando frecuentemente las pistolas de genes caseras basadas en el mismo principio de la compresión de gas, entre ellas se encuentran los de Sautter *et al.* (1991), Takeuchi *et al.* (1992), Finer *et al.* (1992) y Sági *et al.* (1995b).

En los modelos de bajas presiones, los microproyectiles no se depositan en un macroproyectil, sino que son arrastrados por una corriente de gas comprimido que se descarga sobre el blanco. En este caso se deben utilizar presiones muchos menores que las usadas en los equipos de alta presión, con el objetivo de que el gas propulsor no pase a la cámara de disparo y de esta manera se evita el daño al material vegetal. El choque de gas sobre el blanco provoca la dispersión del mismo, que unido al estrés del impacto de los microproyectiles y a la posterior exposición a un medio selectivo, puede causarle severas afectaciones. Para evitar estos problemas, durante el uso de este tipo de pistola, el tejido a bombardear es protegido por una



malla cuyas aberturas dependen de las dimensiones del blanco; la misma es colocada de manera que cubra al tejido o entre éste y la fuente de disparo (Takeuchi *et al.*, 1992).

En general los modelos, ya sean de alta o de baja presión, que utilizan el choque de gas comprimido para acelerar los microproyectiles, tienen la ventaja de poder emplear varias presiones de disparo y por lo tanto variar la velocidad y la fuerza de impacto de los mismos, en dependencia del blanco empleado y la distancia a que se sitúe (Gil *et al.*, 1998).

Numerosos parámetros pueden ser variados para optimizar el sistema de bombardeo (Panis *et al.*, 1996). El método de precipitación usado para adherir el ADN a las micropartículas es de suma importancia. En la mayoría de los casos, el método de precipitación que usa Cloruro de Calcio y Espermidina, es aplicado (Sanford *et al.*, 1993). Para monitorear la cantidad de ADN precipitado sobre las partículas durante el recubrimiento, Ratnayaka y Orad (1995) reportaron el empleo de un método fluorimétrico. El tiempo que transcurre entre el recubrimiento y el bombardeo influye en la efectividad del proceso. Sanford *et al.* (1993) y Ratnayaka y Oard (1995) recomiendan la preparación de las partículas el mismo día del bombardeo y su uso inmediato luego de recubiertas, ya que se ha comprobado que existe una relación inversa entre el tiempo y la eficiencia de disparo. Por otra parte, se recomienda que una vez secados los microproyectiles, los mismos no deben exponerse a la humedad pues aumenta su aglomeración.

Otros parámetros para optimizar el sistema de bombardeo incluyen la presión del gas, condiciones del vacío, cantidad de partículas por disparo, la distancia del blanco y tipos de partículas (Klein *et al.*, 1988a; Panis *et al.*, 1996).

En el proceso de transformación por biobalística, juegan un papel muy importante los aspectos biológicos, de los cuales depende la efectividad máxima del evento. La turgencia de las células



es un aspecto a tener en cuenta, ya que la misma varía entre los diferentes tipos de tejidos. La elevación de la concentración osmótica en el medio de cultivo, puede proteger a las células de la rotura y explosión de las mismas ante el bombardeo, a la vez que mejora la penetración de las partículas y por consiguiente la eficiencia de la transformación, de hecho este criterio ha sido considerado durante el trabajo con suspensiones celulares de tabaco, café y otros cultivos (Sanford *et al.*, 1993; Vain *et al.*, 1993; Van Boxtel *et al.*, 1995).

También debe tenerse en cuenta el tipo y estado fisiológico del blanco, ya que se conoce que las células o tejidos deben encontrarse en crecimiento activo para soportar el estrés del bombardeo, permitir la rápida incorporación del ADN exógeno y la posterior multiplicación de los transformantes (Lida *et al.*, 1991). Las mayores eficiencias son reportadas en células en crecimiento logarítmico temprano, aunque las mismas varían en dependencia del blanco biológico utilizado (Armeleo *et al.*, 1990; Shark *et al.*, 1991; Sanford *et al.*, 1993). Por otra parte, la frecuencia de transformación en suspensiones celulares difiere entre cultivos de diferentes edades (Sági *et al.*, 1995b) y de distintos tamaños celulares (Finer *et al.*, 1992).

Algunos investigadores han sugerido los posibles mecanismos de integración estable del ADN introducido (Kohli *et al.*, 1998), aunque no existen evidencias de los mismos (Kaush *et al.*, 1995). También se ha descrito que los mecanismos naturales de reparación del genoma impiden que el ADN exógeno se replique en próximas generaciones lo que trae como consecuencia bajas eficiencias de integración estable en plantas (Southgate *et al.*, 1995).

Se conoce que no todo el ADN introducido a las células se expresa (Vasil *et al.*, 1991). Un factor que atenta contra los niveles de expresión de los transgenes es la posible integración en sitios metilados dentro del genoma, lo que puede conllevar a la metilación del promotor del ADN exógeno (Southgate *et al.*, 1995). El silenciamiento de genes y la interacción entre los diferentes



genes introducidos también da como resultado modelos de expresión inesperados (Caplan *et al.*, 1998).

Este método encuentra su mayor aplicación en la transformación de plantas. En este sentido han sido obtenidos positivos resultados para una gran variedad de especies vegetales monocotiledóneas y dicotiledóneas, muchas de las cuales no han podido ser transformadas por otro sistema de transferencia de ADN; tal es el caso de cultivos como caña de azúcar, maíz, banano y soja (Gil *et al.*, 1998).

Las ventajas que posee este método de transformación es que intervienen protocolos simples y rápidos, emplean pequeñas cantidades de ADN y los tejidos blancos pueden ser muy variados y de una preparación simple. Además, el equipamiento es fácil de manipular y numerosos parámetros físicos pueden ser variados a conveniencia. No obstante, tiene la desventaja de ser un modelo de menor reproducibilidad respecto a otros métodos, por lo que requiere de una gran experimentación (Gil *et al.*, 1998).

2.7.3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN LOS PLÁTANOS Y BANANOS.

Dos sistemas han resultado en la producción de plantas transgénicas de plátano y banano: transformación mediada por *Agrobacterium* y el bombardeo de micropartículas con el empleo suspensiones celulares embriogénicas (Sági *et al.*, 1998).

En el género *Musa*, May *et al.* (1995) lograron la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* en cultivos de meristemas *in vitro*. Mientras que Moy *et al.* (1998) desarrollaron un método eficaz para la producción de plantas transgénicas de 'Gran Enano' (AAA) y 'FHIA-02' (AAAA) en callos embriogénicos derivados de flores masculinas. Estos autores utilizaron la cepa bacteriana EHA-101. Con esta misma cepa Pérez (2000) obtuvo buenos resultados de expresión transitoria en los cultivares 'Williams' (AAA) y 'Three Hand Planty' (AAB) con el empleo de cultivos de



suspensiones celulares. Ganapathi *et al.* (2001) lograron resultados satisfactorios al transformar el cultivar 'Rasthali' (AAB) con la cepa EHA-105 donde se regeneraron 200 transformantes putativos, de los cuales dos fueron cultivados hasta la madurez en condiciones del invernadero. Estas dos plantas transgénicas resultaron positivas en el ensayo de la detección histoquímica.

Sági *et al.* (1995b) demostraron que se pueden obtener buenos resultados con el empleo de suspensiones celulares en diferentes genotipos. Pese a que la eficiencia de transformación fue influenciada por el genotipo y/o las características de la suspensión celular. Otros autores como Panis *et al.* (1996) y Becker *et al.* (1997) han logrado buenos resultados con suspensiones celulares para el bombardeo de partículas.

Grapin *et al.* (1996b) examinaron seis promotores diferentes para la expresión transitoria y las actividades de estos fueron similares. Altos niveles de expresión transitoria del gen *uidA* fueron obtenidos en las suspensiones celulares de 'Gran Enano' (AAA), después de mejorar los parámetros de bombardeo.

También los parámetros de bombardeo fueron optimizados por Raemaekers *et al.* (1996) al emplear un cañón de partículas modificado. Estudiaron diferentes promotores a nivel de expresión transitoria con el gen reportero *uidA*. Como promedio, fueron observados entre 200 y 1000 puntos azules por 25 mg de células, en el plátano y el banano respectivamente.

El bombardeo con partículas de suspensiones de células embriónicas del cultivar de plátano 'Three Hand Planty' (AAB) dio como resultado la recuperación de una gran cantidad de transformantes putativos. Los análisis moleculares (RCP, análisis de Southern) y bioquímicos (ELISA) demostraron la eficacia del procedimiento de transformación y mostraron que las plantas obtenidas son transgénicas y expresan el gen antifungoso introducido (Remy *et al.*, 1998).



Más *et al.* (2000) utilizaron embriones somáticos en etapa globular del cultivar 'Gran Enano' (AAA) y lograron eficiencias de 33.95 puntos GUS⁺ por cada 100 mg de embriones.

Un método efectivo ha sido desarrollado para la transformación estable y la regeneración del banano Cavendish (*Musa* sp. Grupo AAA) cv. 'Gran Enano' con el método del bombardeo de microproyectiles (Becker *et al.*, 2000). Estos autores bombardearon células embriogénicas con un plásmido que contenían el gen marcador de selección *nptII* y el gen reportero *uidA*. La caracterización molecular de los transformantes demostró que los transgenes se han integrado de manera estable en el genoma del banano.

Schenk *et al.* (1999) emplearon un nuevo promotor (ScBV) en el bombardeo de células embriogénicas de los cultivares 'Williams' (AAA), 'Three Hand Planty' (AAB) y 'Gran Enano' (AAA), en los cuales se encontró que los niveles de expresión fueron variables para diferentes líneas transgénicas, pero en general fue comparable con las actividades de los promotores ubiquitina del maíz y CaMV35S.



3. MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), adscrito a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), Santa Clara, Cuba. El mismo se llevó a cabo durante el período comprendido entre septiembre de 1999 a diciembre de 2002.

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES DE TRABAJO.

MATERIAL VEGETAL.

Como material vegetal se utilizaron flores masculinas inmaduras de las inflorescencias del cultivar híbrido de plátano ‘FHIA-21’ (*Musa* sp. AAAB) (Figura 1). Estas flores masculinas fueron previamente colectadas directamente de las plantas en el campo a una distancia entre 25-30 cm de la última flor femenina. La estación experimental “Pedro Lantigua”, ubicada en el municipio de Remedios y el Instituto Nacional de Investigación en Viandas Tropicales (INIVIT), ambos de la provincia de Villa Clara, fueron los lugares de procedencia de las flores masculinas.



Figura 1. Flores masculinas (pámpana) del cultivar híbrido de plátano ‘FHIA-21’ (*Musa* sp. AAAB)

INSTRUMENTAL

La esterilización de los instrumentales (filtros, placas de Petri, pipetas, espátulas, pipetas Pasteur, platos) utilizados en la manipulación de las suspensiones celulares, se realizó en una estufa a 180°C durante dos horas. Las pinzas y los bisturís se desinfectaron con una solución



de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0% (p/v) durante 15 minutos (Agramonte *et al.*, 1993). Los Erlenmeyers utilizados en los cultivos de las suspensiones celulares, así como las puntas de pipetas SOCOREX se esterilizaron en autoclave a 121°C y a 1.2 kg.cm⁻² de presión durante 40 minutos. Para los trabajos con suspensiones celulares se utilizaron pipetas cortas de vidrio de 5.0 y 10 mL de volumen y una pipeta automática modelo *PIPETBOY* (TECNOMARA). Las operaciones de inoculación, transferencia y manipulación del material vegetal se realizaron en una cabina de flujo laminar.

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave a 121°C de temperatura y 1.2 kg.cm⁻² de presión. El tiempo de la esterilización estuvo en dependencia del volumen de medio de cultivo, según SIGMA (1991). El pH fue ajustado con el uso de ácido clorhídrico (HCl) 1.0 M y/o hidróxido de sodio (NaOH) 1.0 M, previo a la esterilización. En el caso del empleo de medio de cultivo semisólido, se utilizaron frascos de vidrio de 250 mL, los mismos contenían 30 mL de medio de cultivo. Para la formación y maduración de los embriones, se emplearon placas de Petri de 9 cm de diámetro, las cuales contenían 20 mL de medio de cultivo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los experimentos llevados a cabo en los laboratorios se aplicó una lectura completamente aleatoria de las observaciones. Para el análisis estadístico de los resultados de cada experimento se realizaron pruebas multivariadas y multifactoriales. Entre estas pruebas se encuentra el procedimiento ANOVA multifactorial en aquellos estudios en que se establecieron más de un factor, con el objetivo de examinar la acción de los mismos sobre las variables medidas como efectos aislados e interactuando entre sí. Los grupos homogéneos y/o significativamente diferentes fueron hallados a partir de las pruebas de Duncan, Dunnetts'C o



Mann-Whitney. Este procesamiento estadístico de las variables en cada estudio fue posible a través de los programas estadísticos computacionales SPSS/PC+ ver. 9.00 y Statistix ver 1.0, ambas aplicaciones para Windows. El nivel de significación fijado para todas las pruebas fue del 95%, o sea, $p < 0.05$.

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS POR EXPERIMENTO.

3.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

3.1.1. INDUCCIÓN DE CALLOS CON ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS.

Se eliminaron las brácteas hasta que la inflorescencia masculina llegara a un tamaño de 3.0 cm de largo y posteriormente fueron llevadas al laboratorio.

La desinfección del material vegetal se realizó con alcohol al 70% (v/v) durante 15 minutos. Se enjuagaron las flores masculinas tres veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. El material se mantuvo sumergido en agua destilada estéril para evitar su deshidratación. Los fascículos nodales (manos) fueron extraídos con la ayuda de un microscopio estereoscópico, y colocados en frascos de vidrio de 250 mL. Con el objetivo de analizar la respuesta embriogénica de estos fascículos nodales, se establecieron dos rangos de estos: a partir del 5 hasta el 9 y del 10 hasta el 14, siendo cero el meristemo floral. En cada frasco se cultivaron los cinco explantes de cada rango. Esto se combinó con diferentes concentraciones (3.0, 4.0 y 5.0 mg.L^{-1}) del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el medio de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo propuesto por Escalant *et al.* (1994), el cual contenía las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), las vitaminas MS, 1.0 mg.L^{-1} de biotina, 1.0 mg.L^{-1} de ácido indol-3-acético (AIA), 1.0 mg.L^{-1} de ácido naftalenacético (ANA) y 30 g.L^{-1} de sacarosa. A este medio de cultivo se referirá en el trabajo como M1. El mismo fue gelificado con 2.3 g.L^{-1} de Phytigel y ajustado a un pH de 5.8 previo a la esterilización.



Se utilizaron 89 flores masculinas para cada uno de los tratamientos de 3.0, 4.0 y 5.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Después de la colocación de los explantes en el medio de cultivo, los frascos fueron sellados con *parafilm* y se mantuvieron en la oscuridad total a una temperatura de 27±2.0°C durante cinco meses sin la realización del subcultivo. Se hicieron observaciones a simple vista sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas a partir del tercer mes de cultivo y luego cada dos semanas hasta el quinto mes de cultivo. Se evaluó el momento de aparición de las estructuras embriogénicas, así como la cantidad de fascículos nodales que formaron estas estructuras al final del tiempo de cultivo (cinco meses).

Sobre los datos en este experimento se aplicó un test de proporción específicamente el ANDEVAP facilitado por el programa Statistix ver 1.0, para la comparación de los tratamientos entre sí.

3.1.2. ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES.

Para el establecimiento de suspensiones celulares se emplearon embriones somáticos en etapa globular obtenidos de callos con embriogénesis somática. Estos embriones somáticos provenían del tratamiento con rango de 5-9 y con 4.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D en el medio de cultivo del epígrafe anterior. Se colocaron 150-200 mg de masa fresca (mgMF) de estos embriones somáticos obtenidos de los callos formados de las flores masculinas inmaduras en Erlenmeyers de 25 mL y se añadió 3.0 mL de medio de cultivo líquido propuesto por Bieberach (1995). Este medio de cultivo utilizado para el establecimiento de las suspensiones celulares contenía las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), las vitaminas MS, 0.5 mg.L⁻¹ de biotina, 100 mg.L⁻¹ L-glutamina, 100 mg.L⁻¹ de extracto de malta, 1.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 45 g.L⁻¹ de sacarosa. El pH fue ajustado a 5.3 previo a la esterilización. Este medio de cultivo se referirá como M2.

Los Erlenmeyers fueron colocados en un agitador orbital modelo *INFORS* (HT) (Figura 2), bajo condiciones de oscuridad, velocidad de 90 rpm y temperatura controlada a 27°C. Después de



15 días de cultivo se filtró la suspensión celular que se formó a partir de los embriones somáticos, a través de una malla metálica con poros de tamaño de 500 μm . Estos filtrados consistieron en células meristemáticas aisladas y pequeños agregados celulares y constituyeron las suspensiones que se utilizaron en los diferentes experimentos de este trabajo.



Figura 2. Agitador orbital modelo *INFORS* utilizado para el establecimiento y multiplicación de las suspensiones celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

Con el objetivo de determinar el crecimiento celular en esta fase del proceso, se estudió el efecto del 2,4-D en la multiplicación de las células en suspensión, empleándose el medio de cultivo M2, con variación de las concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D, donde se utilizaron cuatro Erlenmeyers como repeticiones en cada tratamiento. El incremento del volumen celular se determinó por el método del volumen de células sedimentadas (VCS) propuesto por Schoofs (1997). Este método consistió en la transferencia del contenido de los

Erlenmeyers a tubos de ensayos cónicos de 15 mL, para luego medir el volumen que ocupan las células después de la decantación de estas a los dos minutos.

Partiendo de una densidad de inóculo de 0.1 mL de VCS se realizaron mediciones a partir del tercer día de cultivo y luego cada tres días, hasta el vigésimo primer día de cultivo, sin renovar el medio de cultivo durante este tiempo.

Para su mantenimiento, las suspensiones celulares fueron subcultivadas en Erlenmeyers de 100 mL y luego en los de 250 mL, siempre con una concentración final de células del 3.0% de VCS. Los subcultivos se realizaron cada 12 días y observaciones periódicas con un microscopio



óptico para comprobar la composición y la vitalidad de las suspensiones celulares mediante fluorescencia con el uso de diacetato de fluoresceína (FDA) (Widholm, 1972).

Para la comparación de los tratamientos fue aplicada la prueba Kruskal-Wallis, mientras que el Mann-Whitney se utilizó para hallar los grupos significativamente diferentes.

3.1.3. FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN MEDIO DE CULTIVO SEMISÓLIDO.

Estudio de la densidad celular y el medio de cultivo

En este experimento se utilizaron suspensiones celulares de ocho meses de edad después de haber sido establecidas y mantenidas en el medio de cultivo M2 con 3.0 mg.L^{-1} de 2,4-D. Para comprobar el efecto de la densidad celular en la formación de los embriones somáticos se estudiaron cuatro densidades: 10, 15, 20 y 25% de VCS.

También se ensayaron dos medios de cultivo diferentes, el primero propuesto por Bieberach (1995), el cual contenía las sales Schenk e Hildebrandt (1972) (SH) a 100%, vitaminas MS 100%, 1.0 mg.L^{-1} de biotina, 100 mg.L^{-1} de extracto de malta, 100 mg.L^{-1} de L-glutamina, 230 mg.L^{-1} de L-prolina, 10 g.L^{-1} de lactosa, 0.05 mg.L^{-1} de zeatina, 100 mg.L^{-1} de mioinositol, 0.2 mg.L^{-1} de ANA, 0.2 mg.L^{-1} de isopenilaminopurina (2ip), 0.1 mg.L^{-1} de Kinetina y 45 g.L^{-1} de sacarosa. El pH se ajustó a 5.3 antes de la esterilización y el medio de cultivo fue gelificado con Phytigel a 2.3 g.L^{-1} . Este medio de cultivo se referirá en lo adelante como M3a. El otro medio de cultivo estudiado fue propuesto por Dhed'a *et al.* (1991), el cual contenía las sales MS a 50%, las vitaminas MS, 100 mg.L^{-1} de mioinositol y 30 g.L^{-1} de sacarosa. Este medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.8 antes de la esterilización y se gelificó con igual concentración de Phytigel que el medio de cultivo anterior. Este medio de cultivo se referirá en lo adelante como M3b.



En platos metálicos estériles se colocó papel de filtro, encima del cual se pusieron mallas de nylon de 1.0 cm². En tubos cónicos de 15 mL se ajustó el porcentaje de volumen de células sedimentadas a estudiar y luego, con una micropipeta (SOCOREX) de 1 000 µL con puntas azules cortadas, se homogenizó la suspensión y se depositaron 150 µL de células (20-25 mg de masa fresca) sobre la malla de nylon, la que retuvo las células y el papel de filtro absorbió el exceso de medio de cultivo. Cada una de estas mallas de nylon representó una repetición y se colocaron cinco mallas por placa de Petri. Se utilizaron diez repeticiones para cada tratamiento.

Las placas de Petri fueron selladas con *parafilm* y colocadas en la oscuridad total a una temperatura de 27±2.0°C. Se realizaron observaciones a simple vista a partir del decimoquinto día de cultivo para estimar el momento de aparición de los primeros embriones somáticos y el conteo de embriones somáticos formados en la etapa globular se realizó a los 45 días de cultivo sin la realización de subcultivo. Para este conteo, los embriones somáticos formados de cada repetición fueron colocados en un *beaker* que contenía una mezcla de Phytigel (2.0 g.L⁻¹) y agua. A continuación se vertió el contenido del *beaker* en una placa de Petri, se dejó gelificar y se dividió en cuadrantes para facilitar el conteo. El mismo se realizó bajo el microscopio estereoscópico modelo *WILD M8* (LEICA).

Se aplicó un ANOVA multifactorial sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Duncan.

Efecto de la edad de la suspensión celular sobre su estado embriogénico

Después de determinar el medio de cultivo y la densidad celular más adecuados para la formación de los embriones somáticos, se realizó un experimento para comprobar el estado embriogénico de suspensiones celulares de 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 meses de establecidas. La preparación de los agregados celulares y las condiciones de cultivo para este experimento



fueron similares al del anterior y con la misma cantidad (10) de repeticiones por tratamiento. Se realizó el conteo de los embriones somáticos en la etapa globular formados después de 45 días de inicio del cultivo.

Se aplicó un ANOVA *one-way* sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Dunnett's C.

3.1.4. MADURACIÓN Y GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS.

Al lograr la formación de los embriones somáticos en la etapa anterior, se procedió a colocarlos en un medio de cultivo propicio para la maduración. Como medio de cultivo se empleó el propuesto por Gómez *et al.* (2000), el cual estaba formado por las sales MS 100%, las vitaminas MS 100%, 1.0 mg.L⁻¹ de Biotina, 0.5 mg.L⁻¹ de N₆-bencilaminopurina (6-BAP), 2.0 mg.L⁻¹ de AIA, y 45 g.L⁻¹ de sacarosa. El mismo fue gelificado con 2.3 g.L⁻¹ de Phytigel y el pH se ajustó a 5.8 antes de la esterilización. Este medio de cultivo se referirá en lo adelante como M4. Las condiciones de cultivo fueron similares al señalado en el epígrafe anterior. Los embriones somáticos en etapa globular que se emplearon en esta fase procedían de todos los tratamientos con el medio de cultivo M3a del epígrafe anterior. Se colocaron cinco mallas de nylon donde se formaron los embriones somáticos en cada placa de Petri que contenía el medio de cultivo M4. Los embriones somáticos permanecieron durante 0, 10, 20 ó 30 días en este medio de cultivo antes de colocarlos en medio de cultivo de germinación.

En la etapa de germinación se emplearon los embriones somáticos formados a diferentes densidades celulares y diferentes tiempos en el medio de cultivo M4 (Tabla 1). Se evaluó el número de embriones somáticos germinados a los 45 días y se realizaron observaciones a simple vista para estimar el momento de aparición de la plúmula clorofílica de los embriones somáticos, formados a diferentes densidades. Los embriones somáticos fueron colocados sobre un medio de cultivo de germinación propuesto por Gómez *et al.* (2000), el cual contenía las



sales MS, las vitaminas MS, 0.5 mg.L⁻¹ de 6-BAP, 2.0 mg.L⁻¹ de AIA, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 0.01 mg.L⁻¹ de Biobrás-6, y 30 g.L⁻¹ de sacarosa. El pH fue ajustado a 5.7 antes de la esterilización y el medio de cultivo se gelificó con 2.3 g.L⁻¹ de Phytigel. Este medio de cultivo se referirá en lo adelante como M5.

Tabla 1. Variantes empleadas para evaluar el efecto de la densidad celular en la que se forman los embriones somáticos y el tiempo de permanencia de estos en el medio de cultivo M4 sobre la germinación.

Tratamiento	Densidad celular (%)	Días en medio M4
1	10	0
2	15	0
3	20	0
4	25	0
5	10	10
6	15	10
7	20	10
8	25	10
9	10	20
10	15	20
11	20	20
12	25	20
13	10	30
14	15	30
15	20	30
16	25	30

Se emplearon frascos de vidrio de 250 mL. Por cada frasco se colocaron 10 embriones somáticos en contacto directo con el medio de cultivo. Cada frasco representó una repetición y se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. Los frascos fueron colocados en cámaras de crecimiento con luz solar a una densidad de flujo de fotones fotosintéticas (DFFF) de 50 - 62.5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y una temperatura de $27\pm 2.0^\circ\text{C}$. El medio de cultivo fue renovado a los 30 días de cultivo.

Se aplicó un ANOVA multifactorial sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Dunnett's C.



3.1.5. CONVERSIÓN DE LAS PLANTAS OBTENIDAS DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS.

Para estudiar el comportamiento *ex vitro* de una población de plantas obtenidas a partir de embriones somáticos, un total de 500 plantas germinadas fueron llevadas a la fase de aclimatización. Estas plantas procedían de embriones somáticos formados a 15% de densidad celular y permanecieron de 20 a 30 días en el medio de cultivo M4. Las mismas tenían 50 días después de su germinación. Junto a estas plantas se llevaron igual número de plantas obtenidas a partir de yemas axilares vía organogénesis, empleándose el medio de cultivo propuesto por Orellana (1994) para su multiplicación. Estas plantas procedían del sexto subcultivo.

La aclimatización se realizó en condiciones ambientales con la luminosidad reducida de 60-70% mediante una malla o zarán. Se plantaron las vitroplantas en cajas de polieturano de 70 orificios de forma cuadrada, de 120 cm³ de volumen. El sustrato usado fue la mezcla de 75% de compost y 25% de zeolita más la fertilización con la fórmula completa 8-13-21 a dosis de 2.5 Kg.m⁻³ (Daniels, 1999). La temperatura fue la ambiental y el riego fue realizado tres veces al día con una duración de 10 minutos por microaspersión.

Se hizo una comparación entre ambas poblaciones de plantas según sus procedencias. Se realizó la evaluación de la supervivencia a los 10 días de plantadas y a los 50 días de plantadas se evaluó la altura de las plantas, el número de hojas y los cambios morfológicos (la forma y coloración del pseudotallo y las hojas) a 50 plantas de cada población.

Se aplicó un ANOVA *one-way* y en ambos casos la comparación de media se hizo según la prueba de Dunnett's C.



3.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA POR BIOBALÍSTICA.

Para los experimentos de transformación genética por biobalística, se utilizó una pistola de genes de baja presión (CINVESTAV, 2000) (Figura 3) con el argón como gas propulsor.

La purificación de todos los plásmidos utilizados se realizó según el protocolo de lisis alcalina propuesto por Sambrook *et al.* (1989).



Figura 3. Pistola de genes (CINVESTAV) de baja presión empleado para la transformación genética de suspensiones celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa sp.* AAAB).

Se procedió a la determinación de la concentración de ADN por espectrofotometría, donde su pureza se comprobó por una densidad óptica (DO) de 260-280 nm y la contaminación por fenoles se hizo a una DO de 230 nm.

En todos los ensayos de transformación genética se usaron micropartículas de tungsteno M-10 (Bio-Rad) con tamaño de 0.7 μm . La desinfección y recubrimiento de las micropartículas con ADN se llevó a cabo de acuerdo al protocolo propuesto por Sanford *et al.* (1993).

La desinfección se hizo de la siguiente manera:

1. En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, pesar 60-64 mg de micropartículas.
2. Añadir 1.0 mL de etanol al 70% (preparado fresco).
3. Agitar en vortex por cinco minutos a alta velocidad.
4. Dejar reposar durante 15-17 minutos.



5. Obtención del pelet por centrifugación durante cinco minutos a $13\ 600 \times g$ en una centrifuga *Eppendorf Centrifuge* modelo 5415 C.
6. Sacar el líquido del tubo lentamente.
7. Realizar los siguientes pasos tres veces:
 - a. Adicionar 1.0 mL de agua estéril.
 - b. Agitar en vortex por un minuto a alta velocidad.
 - c. Dejar que las partículas se asienten durante un minuto.
 - d. Obtener el pelet de micropartículas por centrifugado en un tiempo de 2-5 minutos. Aunque el tiempo de centrifugado estará en dependencia si el pelet se forma bien o no.
 - e. Sacar el líquido lentamente del tubo.
8. Adicionar 1.0 mL de 40% Polietilenglicol (PEG 6000) estéril, asumiendo que la concentración de micropartículas es de 60 mg.
9. Guardar las micropartículas a -20°C

Para la toma de alícuotas de micropartículas, fue importante mantener el tubo en el vortex en agitación constante a fin de obtener la máxima uniformidad de la muestra. En el monitoreo de la precipitación del ADN sobre las micropartículas, se aplicó el método descrito por Ratnayaka y Orad (1995) con la observación bajo el microscopio óptico.

En estos ensayos se utilizaron suspensiones celulares embriogénicas de ocho a diez meses de edad después de haber sido establecidas. Se ajustó la suspensión celular en un tubo cónico de 15 mL a una densidad celular de 25% VCS, ya que se mueren algunas células después del bombardeo a causa del impacto de las micropartículas. Se utilizaron agregados celulares recolectados cinco días después del subcultivo (Sági *et al.*, 1995a). Sobre cada plato metálico estéril, se colocó papel de filtro estéril, encima del cual se pusieron mallas de nylon de 1.0 cm^2 . Con la micropipeta (SOCOREX) de $1\ 000\ \mu\text{L}$ y puntas azules (punta picada), se homogenizó la suspensión y luego se depositaron $150\ \mu\text{L}$ de la suspensión celular (aproximadamente 25 mg de masa fresca) sobre la malla de nylon, la cual retuvo las células y el papel de filtro absorbió el exceso de medio de cultivo. Cada una de estas mallas de nylon representó una repetición.



Cada disparo se realizó en el centro de una placa de Petri estéril de 5.0 cm de diámetro y sin medio de cultivo, después de colocar una malla de nylon con las células en dicha placa. Para evitar su dispersión tras el disparo, se colocó una malla de nylon de tamaño de poros de 1.0 mm² sobre las células. Todos los disparos se realizaron a -21 pulgadas de Hg de vacío.

Después del disparo, se ubicó la malla de nylon con las células en una placa de Petri de 9.0 cm de diámetro, la cual contenía el medio de cultivo M2 con 3.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D usado para la multiplicación de la suspensión celular y gelificado con Phytigel a 2.3 g.L⁻¹. Estas placas fueron selladas con *parafilm* y colocadas en la oscuridad total a una temperatura de 27±2.0°C durante tres días para que las células se recuperaran del daño sufrido por el impacto de las micropartículas.

Al transcurrir los tres días, la detección histoquímica del GUS se llevó a cabo mediante la transferencia de las células a los tubos Eppendorf de 1.5 mL y seguidamente, se adicionaron a los tubos 50 µL del sustrato X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucurónido) (Jefferson, 1987), el cual bajo la acción de la enzima produce un producto incoloro (5-bromo-4-cloro-3-indolil) que sufre una dimerización oxidativa y forma un precipitado azul insoluble (dicloro-dibromo-índigo) en el mismo sitio de la acción de la enzima. Luego de una incubación a 37°C en la oscuridad durante 24 horas de las células, fue realizada la observación de la actividad GUS y el conteo de los puntos azules a través de un microscopio estereoscópico (OLYMPUS).



3.2.1. ESTUDIO DE LA DISTANCIA Y LA PRESIÓN PARA EFECTUAR EL DISPARO SOBRE EL BLANCO BIOLÓGICO.

Para el primer estudio de los parámetros físicos, se realizó un experimento donde se emplearon cuatro presiones y cuatro distancias como se muestra en la tabla 2, ya que son dos parámetros que influyen en el éxito del proceso de la transformación genética por biobalística.

Tabla 2. Combinaciones de distancia del blanco biológico y presión del disparo, empleadas en el estudio de la actividad transitoria del gen *uidA* en agregados celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Tratamientos	Distancia (cm)	Presión (psi)
1	6	120
2	6	130
3	6	140
4	6	150
5	9	120
6	9	130
7	9	140
8	9	150
9	12	120
10	12	130
11	12	140
12	12	150
13	15	120
14	15	130
15	15	140
16	15	150

En este experimento se realizó un disparo sobre los agregados celulares. Se emplearon por disparo 7.0 μ L de suspensión de micropartículas recubiertas con el ADN plasmídico, la cual fue agitada previamente en el vortex. Se colocaron estas micropartículas en un filtro ubicado en la parte superior de la cámara de vacío dentro de la pistola de genes.

Antes de cada disparo, se cerró la puerta de la cámara, se creó el vacío, se cargó y se disparó la pistola de genes y finalmente se eliminó el vacío lentamente.



Cada malla de nylon con los agregados celulares representó una repetición y se emplearon 10 repeticiones por tratamiento.

Todos los estudios para ajustar los parámetros en la transformación genética vía biobalística se hicieron con las micropartículas de tungsteno recubiertas con el plásmido pUGCI (6.86kb), el cual contiene el gen reportero *uidA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS) (Jefferson *et al.*, 1987). Este gen está bajo el control del promotor poliubiquitina del maíz y terminador T-Nos. Se determinó la detección histoquímica GUS en los agregados celulares.

Se aplicó un ANOVA multifactorial sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Duncan.

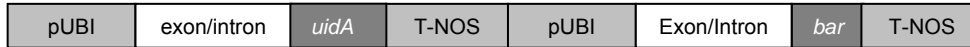
3.2.2. ESTUDIO DE DIFERENTES CONSTRUCCIONES GENÉTICAS.

Se procedió al estudio de diferentes construcciones genéticas con diferentes promotores, ya que estos influyen en la inserción de los genes en el genoma de la planta. Para este experimento las condiciones y preparaciones de la suspensión celular, así como el protocolo de recubrimiento de las micropartículas fueron igual al descrito en el epígrafe 3.2.

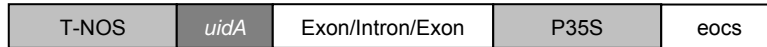
Se utilizaron en este experimento los plásmidos pAHC25 (9.7 kb), pBPF-A5-GUS (5.637 kb), pUGCI (6.86 kb), pCAMBIA3301 (5.077 kb) y pBPF- Ω 5 (6.37 kb). La representación esquemática de cada plásmido se aprecia en la figura 4.



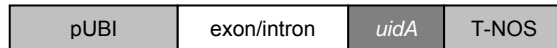
A pAHC25 (9.7kb)



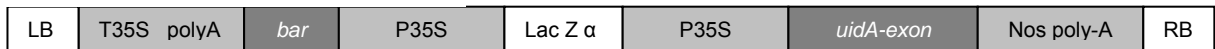
B pBPF-A5-GUS (5.637kb)



C pUGCI (6.86kb)



D pCAMBIA3301 (5.077kb)



E pBPF- Ω 5 (6.37kb)

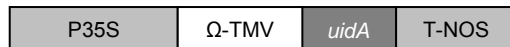


Figura 4. Representación esquemática de los plásmidos empleados en la transformación genética de agregados celulares del cultivar híbrido de plátano ‘FHIA-21’. (pUBI-promotor de la poliubiquitina del maíz, *uidA*-gen reportero que codifica para la β -glucuronidasa, P35S y T35S-promotor y terminador del virus de mosaico de coliflor, *bar*- gen que codifica para la fosfinotricina acetiltransferasa, T-NOS-terminador de la nopalina sintetasa, eocs-enhancer sintético de la octapina sintetasa).

En este experimento se emplearon 10 repeticiones por cada tratamiento. Luego de los disparos, se colocaron los agregados celulares en placas de Petri con el medio de cultivo M2 con 3.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D gelificado con 2.3 g.L⁻¹ de Phytigel. Estos fueron incubados en la oscuridad total a una temperatura de 27 \pm 2.0°C durante tres días para que las células se recuperaran del estrés causado por el impacto de las micropartículas. Al transcurrir este tiempo se realizó la detección histoquímica de la actividad transitoria de la β -glucuronidasa para todos los tratamientos y se realizó el conteo de los agregados celulares que expresan la actividad β -glucuronidasa.



Se aplicó un ANOVA *one-way* sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Duncan.

3.2.3. ENSAYO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EL RECUBRIMIENTO DE LAS MICROPARTÍCULAS.

Se estudiaron tres protocolos de recubrimiento de las micropartículas, ya que este juega un papel fundamental en los resultados finales de la transformación genética vía biobalística. Se empleó el plásmido pUGCI, una distancia de 12 cm y una presión de 140 psi. La descripción de cada uno de los protocolos se realiza a continuación:

Protocolo propuesto por Sanford *et al.* (1993).

1. Agitar en el vortex la solución de micropartículas con 40% de PEG durante cinco minutos para resuspender y destruir aglomerados de partículas.
2. Sacar 50 μL (3 mg) de micropartículas y poner en otro tubo estéril de microcentrifuga de 1.5 mL, todo esto con el vortex a baja velocidad.
3. En estas mismas condiciones añadir en el tubo:
 - ⇒ 5 μL de ADN.
 - ⇒ 50 μL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ o CaCl_2 (2.5 M) a pH 5.
 - ⇒ 20 μL de espermidina (0.1 M). Agitar bien varias veces con la micropipeta.
4. Continuar agitando en el vortex por 2-3 minutos a alta velocidad.
5. Seguidamente detener el vortex y dejar que las micropartículas se asienten por un minuto.
6. Obtener el pelet por centrifugación durante 10 segundos.
7. Sacar el líquido sobrenadante lentamente.
8. Adicionar 140 μL de etanol al 70% sin tocar el pelet.
9. Sacar todo el etanol lentamente.
10. Adicionar 140 μL de etanol al 100% sin mover el pelet.
11. Sacar el etanol de nuevo lentamente.



12. Adicionar 50 μL de etanol al 100%.

Protocolo propuesto por Klein *et al.* (1988a).

1. En un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, colocar 25 μL de la suspensión de micropartículas (0.05 g/mL de agua destilada).
2. Agregar 5 μg de ADN plasmídico (generalmente 5 μL de una solución a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, aunque puede usarse cantidades mayores).
3. Agitar en vortex.
4. Agregar 25 μL de una solución de CaCl_2 (2.5 M) durante la agitación en el vortex.
5. Agregar 10 μL de la solución de espermidina (0.1 M) durante la agitación en vortex.
6. Dejar en reposo 10 minutos sobre hielo.
7. Dar un golpe de centrifuga.
8. Eliminar con cuidado el sobrenadante.
9. Agregar 200 μL de etanol absoluto y dar vortex hasta resuspender las partículas.
10. Dar un golpe de centrifuga y eliminar cuidadosamente todo el sobrenadante.
11. Repetir una vez más los pasos 9 y 10.
12. Resuspender finalmente las partículas en 30 μL de etanol absoluto. Dar vortex por unos segundos.

Protocolo propuesto por Legavre (1995).

1. En un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, añadir 1.2 μL de plásmido a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (6 μg).
2. Añadir 5 μL de etanol absoluto a temperatura ambiental en tomas de 1 μL para evitar la precipitación del ADN. (Debe mantenerse a temperatura ambiental para evitar también la precipitación del ADN).
3. Agregar 12 μL de la suspensión de tungsteno (2400 μg).
4. Agitar manipulando la pipeta.



5. Debe dejarse secar bien en el laminar.

Al finalizar los disparos, se colocaron los agregados celulares en placas de Petri con el medio de cultivo M2 con 3.0 mg.L^{-1} de 2,4-D y gelificado con el Phytigel a 2.3 g.L^{-1} . Después de tres días de cultivo, se realizó la tinción con el sustrato X-Gluc y se contaron los puntos azules por el procedimiento descrito en el epígrafe 3.2. Se utilizaron 10 repeticiones por cada tratamiento.

Se aplicó un ANOVA *one-way* sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Duncan.

3.2.4. ESTUDIO DE LA CANTIDAD DE MICROPARTÍCULAS Y NÚMERO DE DISPAROS.

Luego de determinar la presión, la distancia de disparo y el protocolo de recubrimiento de las micropartículas con mejores resultados, se procedió a estudiar la cantidad de micropartículas por disparo y el número de disparos sobre el mismo blanco biológico. Se estudió 7.0, 9.0 y 11.0 μL de la suspensión de micropartículas recubiertas con el plásmido (pUGCI), efectuándose uno y dos disparos en cada caso sobre el mismo blanco (Tabla 3). Según la preparación de las micropartículas, las cantidades de la suspensión de micropartículas empleadas son equivalente a 0.42, 0.54 y 0.66 mg por disparo respectivamente.

Tabla 3. Variantes estudiadas para determinar la cantidad de micropartículas por disparo y número de disparo sobre el mismo blanco biológico en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Tratamiento	Cantidad de micropartículas (mg)	Número de disparo por muestra
1	0.42	1
2	0.54	1
3	0.66	1
4	0.42	2
5	0.54	2
6	0.66	2

En este ensayo se utilizaron los parámetros estudiados y determinados en los experimentos anteriores. La evaluación de la actividad transitoria de la enzima β -glucuronidasa se realizó de



la manera descrita en el epígrafe 3.2. Se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. Este experimento se repitió tres veces.

Se aplicó un ANOVA multifactorial sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Dunnett's C.

3.2.5. EFECTO DEL TIEMPO DESPUÉS DEL SUBCULTIVO DE LA SUSPENSIÓN CELULAR SOBRE LA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN.

Todos los parámetros estudiados anteriormente juegan un papel importante en el éxito de la transformación genética, sin embargo, los parámetros biológicos también influyen en los resultados finales. En este experimento se estudiaron agregados celulares con diferentes tiempos en días después del último subcultivo, teniendo en cuenta los mejores parámetros determinados en los experimentos anteriores, ya que la calidad de los agregados celulares juega un papel fundamental en la eficiencia de la transformación. Se probaron agregados celulares provenientes del quinto, décimo y decimoquinto día después del último subcultivo.

El procedimiento para los disparos se realizó de acuerdo a lo descrito en el epígrafe 3.2. Se evaluó la actividad transitoria de la enzima β -glucuronidasa. Se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. Este experimento se repitió tres veces.

Se aplicó un ANOVA *one-way* sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Dunnett's C.

3.2.6. EFECTO DEL ESTADO FÍSICO DEL MEDIO DE CULTIVO Y EL TIEMPO DE PRECULTIVO DE LAS CÉLULAS ANTES DE LOS DISPAROS.

Para estudiar el efecto del estado físico del medio de cultivo donde se cultivan las células antes del bombardeo, se diseñó este experimento donde se prepararon los agregados celulares



cultivados en dos medios de cultivo: 1) M2 líquido, con 3.0 mg.L^{-1} de 2,4-D, el cual fue el testigo; 2) M2 semisólido, con 2.3 g.L^{-1} de Phytigel. Los agregados celulares se cultivaron en el medio de cultivo semisólido para uno, tres y cinco días antes de efectuar el bombardeo.

En este ensayo se utilizaron los siguientes parámetros: una distancia de 12 cm, una presión de 140 psi, el plásmido pUGCI, $7.0 \mu\text{L}$ de micropartículas con un disparo sobre los agregados celulares recolectados cinco días después del último subcultivo. La evaluación se realizó mediante el análisis de la actividad transitoria de la enzima β -glucuronidasa. Se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. Este experimento se repitió tres veces. Se aplicó un ANOVA *one-way* sobre los datos y la comparación de medias se hizo con la prueba de Duncan.

3.2.7. DETERMINACIÓN DE LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DEL HERBICIDA 'BASTA' SOBRE LOS AGREGADOS CELULARES.

La selección de los explantes transformados en medios de cultivo que contienen un agente selectivo es fundamental en el desarrollo de un protocolo de transformación genética. Una buena selección permite obtener un alto porcentaje de plantas positivas al transgen con respecto a la cantidad de plantas regeneradas.

En este experimento se utilizaron agregados celulares preparados de la manera descrita en el epígrafe 3.2. Se depositaron $150 \mu\text{L}$ de suspensión celular a 25% de VCS sobre mallas de nylon de 1.0 cm^2 . Estas mallas, que retienen los agregados celulares, fueron colocadas en placas de Petri que contenía el medio de cultivo M2 con 3.0 mg.L^{-1} de 2,4-D y gelificado con 2.3 g.L^{-1} de Phytigel. Cada una de estas mallas de nylon representó una repetición y se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. Se estudiaron diferentes concentraciones (0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 mg.L^{-1}) del herbicida BASTA en el medio de cultivo para determinar la mínima concentración inhibitoria. Las placas de Petri se colocaron en condiciones de cultivo de



oscuridad total y temperatura de $27 \pm 2.0^\circ\text{C}$. Se realizaron evaluaciones a partir de la segunda semana de cultivo y luego cada dos semanas hasta la décima semana de cultivo. Se renovó el medio de cultivo cada dos semanas de cultivo. Las evaluaciones se hicieron de acuerdo a la escala de grado propuesta por Santana (1982) y modificada por Busot *et al.* (1999), la cual se describe a continuación:

Grado	Descripción
1	Células muertas
2	Células vivas sin crecimiento
3	Células vivas con pequeñas zonas de crecimiento
4	Células vivas creciendo en un 50%
5	Células con crecimiento normal (100%)

Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis *one-way* AOV sobre los datos observados en este estudio.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

La embriogénesis somática es una alternativa más eficiente que la organogénesis para la propagación masiva de plantas (Villalobos y Torpe, 1991). Esta técnica también puede ser empleada de herramienta para la transformación genética, ya que esta depende de un sistema de regeneración eficiente y confiable. A continuación se presentarán los resultados obtenidos en las diferentes etapas de la embriogénesis somática en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

4.1.1. INDUCCIÓN DE CALLOS CON ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS.

En esta fase del proceso de la embriogénesis somática, todos los explantes (fascículos nodales) formaron glóbulos meristemáticos después de cuatro semanas en el medio de inducción sin la realización del subcultivo, sin embargo, sólo pocos de estos glóbulos formaron callos con estructuras embriogénicas (Figura 5).

La producción de estas estructuras embriogénicas se observó a partir de las 12 semanas de cultivo. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la concentración de 2,4-D influyó sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de callos con estructuras embriogénicas formados a las 20 semanas de cultivo en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

Posición de los fascículos nodales	Concentración de 2,4-D (mg.L ⁻¹)		
	3	4	5
5-9	2.25 bc	6.52 a	4.49 ab
10-14	0 d	2.02 bc	1.12 cd

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según un test de proporción.

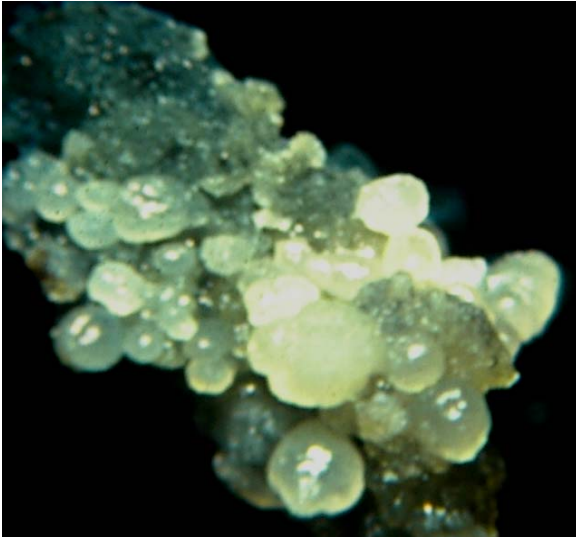


Figura 5. Embriones somáticos formados de los callos del rango 5-9 y con 4.0 mg.L^{-1} de 2,4-D en el medio de cultivo del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB), a las 20 semanas de cultivo.

Al utilizar una concentración de 4.0 mg.L^{-1} de 2,4-D, se produjeron porcentajes numéricamente superiores con diferencia significativa al tratamiento con 3.0 mg.L^{-1} , pero sin diferencia significativa del tratamiento con 5.0 mg.L^{-1} de 2,4-D.

El 2,4-D es la auxina más usada para inducir la embriogénesis somática y el éxito de este proceso se atribuye a la potencia de la misma para reprogramar las células a un estado embriogénico (Schoofs *et al.*, 1999).

Asimismo, altas concentraciones de esta auxina pueden inhibir el crecimiento celular (Barceló *et al.*, 1995), lo cual pudiera ser la causa de la caída de los porcentajes al utilizar 5.0 mg.L^{-1} de 2,4-D. Para los dos rangos de fascículos nodales se observó este comportamiento. Torres (2002) planteó que altas concentraciones de 2,4-D pueden acelerar la respiración de las células, creándose un desacople fosforilativo que inhibe el crecimiento celular.

La baja producción de callos con estructuras embriogénicas es una de las principales limitaciones en la embriogénesis somática en el *Musa*. Escalant *et al.* (1994) plantearon que la respuesta embriogénica de flores masculinas inmaduras en el cultivar triploide 'Gran Enano' (AAA) nunca excedió el 5.0% cuando se utilizó una concentración de 4.0 mg.L^{-1} de 2,4-D en el medio de cultivo. Côte *et al.* (1996) plantearon que después de cultivar flores masculinas inmaduras de 'Gran Enano', durante cinco a seis meses, fueron obtenidos callos amarillos compactos y tejidos embriogénicos friables con numerosos embriones. La respuesta en los



tipos Cavendish y bananos de zonas altas es, sin embargo, altamente variable y normalmente está por debajo de 1.0% cuando se utilizan *scalps* como explantes (Schoofs, 1997).

La forma en que el 2,4-D induce el estado embriogénico aún no está clara, sin embargo, Parrott (1993) indicó que la presencia del 2,4-D ha sido asociada con la metilación del ADN, que supuestamente resulta en una disminución o terminación de los programas de expresión génica existente dentro de las células. Otro efecto del 2,4-D parece ser la imposición de la polaridad, posiblemente como una consecuencia del transporte polar de las auxinas (Schoofs, 1997).

Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con lo planteado por Navarro *et al.* (1997), quienes lograron la formación de callos amarillos compactos, sin embargo, sólo del 2.0 al 6.0% del número inicial de explantes dieron origen a callos blancos embriogénicos. Grapin *et al.* (1998) señalaron valores de 1.9% y 2.9% en dos cultivares de plátano vianda ‘Curaré Enano’ (AAB) y ‘Curaré’ (AAB) respectivamente, con el empleo de flores femeninas como explantes. Todos estos resultados fueron corroborados por Schoofs *et al.* (1999) quienes plantearon que la respuesta embriogénica está en dependencia del genotipo usado. Parrott (1993) explicó que los genotipos individuales dentro de una especie difieren ampliamente en su habilidad de experimentar la embriogénesis somática, y por lo tanto, tales diferencias genotípicas en la capacidad embriogénica probablemente reflejan diferencias en la habilidad de activar el camino embriogénico.

Los fascículos nodales más diferenciados (10-14) tuvieron una respuesta embriogénica más baja con diferencia significativa respecto a los fascículos nodales de 5-9 para cada concentración de 2,4-D estudiada. Estos resultados pudieran deberse a que los fascículos nodales de 10-14 tenían células con mayor “distancia” epigenética del estado embriogénico que los fascículos nodales menos diferenciados (Merkle *et al.*, 1995).



Escalant *et al.* (1994) plantearon que en el 'Gran Enano', el 74% de los agregados embriogénicos formados fueron distribuidos entre las posiciones de siete a trece. Con respecto al rango de los fascículos nodales en este trabajo, los mejores resultados se obtuvieron con las posiciones de 5-9, los cuales concuerdan con los resultados de Del Sol en 1995, donde se obtuvo callos embriogénicos en los cultivares 'Gran Enano', 'Parecido al Rey' (AAA) y 'Bluggoe' (ABB), con el mismo rango de fascículos nodales. Este mismo autor propuso concentraciones óptimas de 2,4-D en esta etapa entre 3.29 a 3.98 mg.L⁻¹ para los diferentes cultivares estudiados, sin embargo, no fue posible obtener estos callos embriogénicos para el cultivar 'FHIA-03' (AABB).

Basado en los resultados obtenidos en este experimento y la concordancia con lo planteado por Escalant *et al.* (1994) y Del Sol (1995), se seleccionó una concentración de 4.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D en el medio de inducción propuesto por Escalant *et al.* (1994), así como la utilización del rango de fascículos nodales de 5-9 para la formación de callos con estructuras embriogénicas en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'. La concentración de 4.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D fue seleccionada, ya que Pérez (1998) planteó que altas concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo pueden provocar la variación genética en las plantas regeneradas, así para disminuir la aparición de posibles variaciones somaclonales, se seleccionó esta concentración.

4.1.2. ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES.

Durante los 15 días de cultivo de los embriones somáticos, obtenidos del estudio anterior, estos liberaron células al medio de cultivo líquido en agitación constante, obteniéndose como resultado una suspensión celular. La figura 6 muestra un comportamiento similar para todas las concentraciones de 2,4-D evaluadas en este experimento, con un aumento del crecimiento celular hasta el decimoquinto día de cultivo, después del cual no hubo multiplicación celular y luego una disminución en el número total de las células en la suspensión. Esto pudiera ser



debido a la muerte celular provocada por una alta densidad celular y la oxidación de los fenoles (Schoofs *et al.*, 1999).

El cese de la multiplicación celular a los 15 días de cultivo en suspensión pudiera atribuirse al agotamiento de los elementos nutritivos del medio de cultivo, así como la fuerte competencia a altas densidades celulares por el espacio y oxígeno para desarrollarse (Schoofs, 1997). Vasil y Vasil (1982) plantearon que el cese de la multiplicación se atribuye a la acumulación de desechos del metabolismo celular, la cual disminuye gradualmente la velocidad de la división hasta dar inicio a la fase estacionaria.

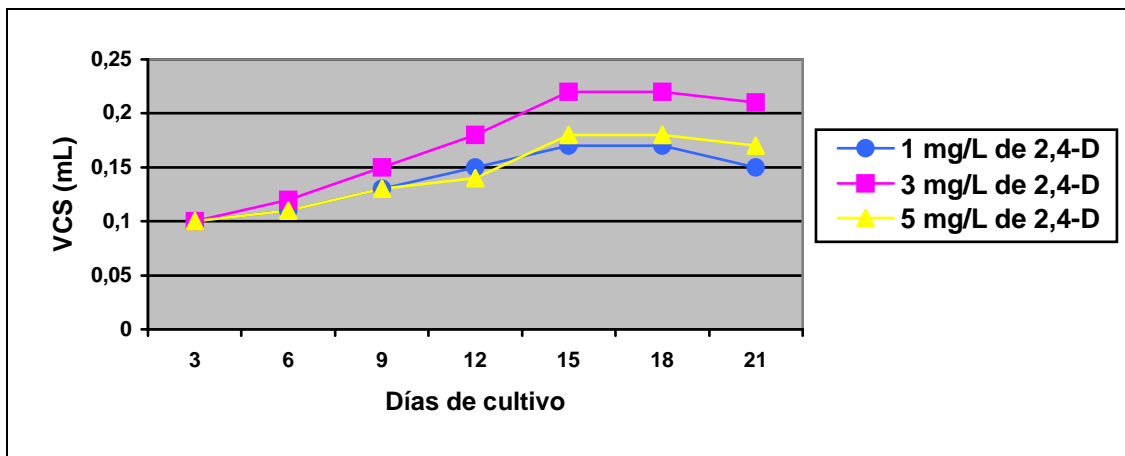


Figura 6. Comportamiento del crecimiento celular en la multiplicación de la suspensión celular en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa sp.* AAAB).

El tratamiento con 3.0 mg.L^{-1} de 2,4-D tuvo un comportamiento superior al resto con diferencia significativa a partir del día doce hasta la última evaluación a los 21 días (Tabla 5).

Vásquez y Torres (1995) hacen referencia a los efectos fisiológicos que ejerce la auxina sobre el alargamiento celular, los cuales están basados en una serie de modificaciones de las células.



Tabla 5. Volúmenes de células sedimentadas (mL) a partir del duodécimo día de cultivo en la multiplicación de la suspensión celular del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

	Días	12	15	18	21
Concentración					
1.0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D		0.15 b	0.17 b	0.17 b	0.15 b
3.0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D		0.18 a	0.22 a	0.22 a	0.21 a
5.0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D		0.14 b	0.18 b	0.18 b	0.17 b

Medias con letras distintas por columnas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Mann-Whitney

Los niveles de auxinas necesarios para mantener la embriogénesis repetitiva varían entre especies y cultivares (Schoofs, 1997). Dhed'a *et al.* (1991) publicaron que las suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* son mantenidas en concentraciones de auxinas relativamente altas. Bieberach (1995), Grapin *et al.* (1996), Côte *et al.* (1996), Barranco (2001) y Cabrera (2001) establecieron y mantuvieron suspensiones celulares de diferentes cultivares de *Musa* con 1.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D en el medio de cultivo. Por otra parte, para el 'FHIA-21', la concentración de 2,4-D de mejor comportamiento resultó ser 3.0 mg.L⁻¹, la cual se empleó para la multiplicación de la suspensión celular (Figura 7). Esto demuestra una vez más la influencia del genotipo sobre los resultados en condiciones *in vitro*.

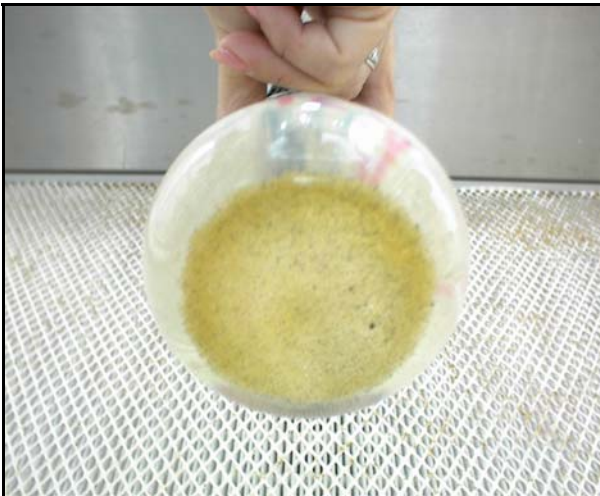


Figura 7. Suspensión celular en multiplicación del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

A partir de los resultados de este experimento se determinó que los subcultivos de las suspensiones celulares se deben realizar a los 12 días de cultivo, ya que el decimoquinto día representa el final de la fase exponencial de la curva de crecimiento (Figura 6). Nayak y Sen (1989) encontraron que el intervalo de subcultivo influye en la frecuencia relativa de las células embriogénicas y cuando las



suspensiones celulares no se subcultivan frecuentemente, estas se tornan mucilaginosas. Este mismo fenómeno se observó en suspensiones celulares de *Musa* (Panis, 1995).

Después de 20 meses de cultivo, las suspensiones celulares pierden sus características embriogénicas. El color de la suspensión celular cambia y las células son menos densas. Para evitar esto, el medio de cultivo debe ser renovado antes de llegar al final de la fase exponencial de la curva de crecimiento (Schoofs *et al.*, 1999).

La densidad celular parece tener un impacto sobre la proliferación de las células y el mantenimiento de las características embriogénicas (Schoofs, 1997).

Las observaciones bajo el microscopio óptico revelaron que predominaban los agregados celulares de tamaño 50-400 μm , que representaron entre 90-95% de la suspensión. La cantidad de células aisladas y parenquimatosas disminuyó a medida que se fueron realizando los siguientes subcultivos.

Dhed'a *et al.* (1991), a partir de los *scalps* en el cultivar 'Bluggoe' (ABB) y con el empleo del medio de cultivo ZZI entre las 16-24 semanas, obtuvieron grupos de células, caracterizados por células embriogénicas pequeñas y esféricas, con un contenido citoplasmático denso, vacuolas pequeñas, gránulos de almidón y una alta razón núcleo/citoplasma. Según De Vries *et al.* (1988), estas características se consideran como un indicativo de la condición embriogénica de las suspensiones celulares. Similares resultados han sido obtenidos por Schoofs (1997), al establecer suspensiones celulares en el cultivar 'Three Hand Planty' (AAB), en medio de cultivo ZZI y como explante inicial, embriones somáticos obtenidos de callos provenientes de los *scalps*.



Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, se determinó que se deben subcultivar las suspensiones celulares cada 12 días, con la utilización del medio de cultivo propuesto por Bieberach (1995) adicionándosele 2,4-D a una concentración de 3.0 mg.L⁻¹.

4.1.3. FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN MEDIO DE CULTIVO SEMISÓLIDO.

Estudio de la densidad celular y el medio de cultivo

No obstante de haberse realizado el conteo de los embriones somáticos a los 45 días de cultivo y sin el cambio de medio de cultivo, ya se había observado la aparición de los primeros embriones somáticos en etapa globular a los 20 días (Figura 8A). Sólo a los 45 días se obtuvo el mayor número de embriones somáticos en etapa globular (Figura 8B).

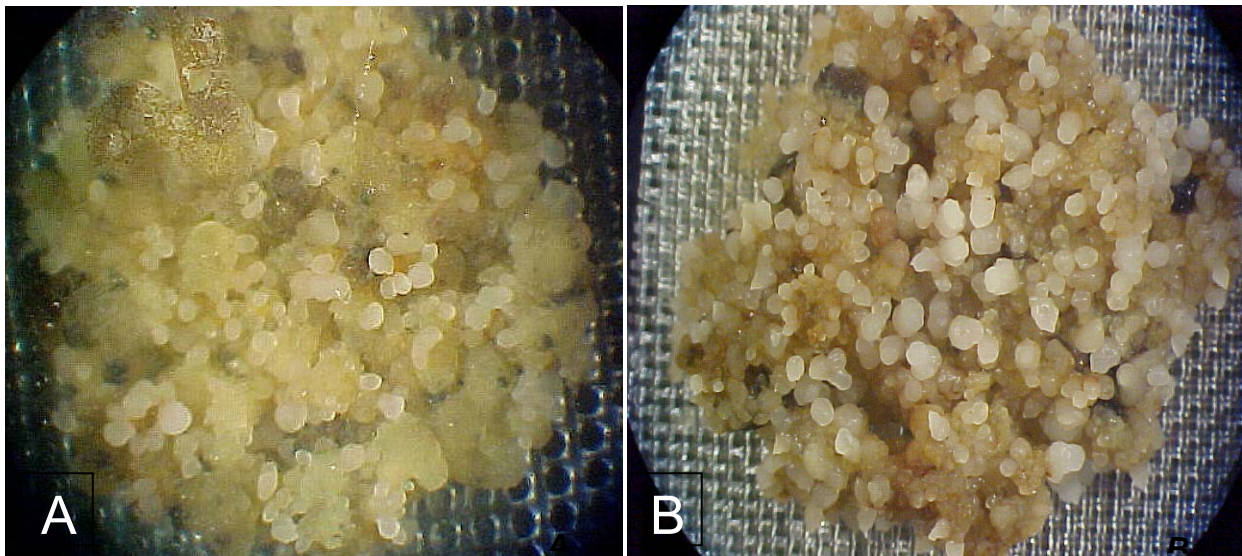
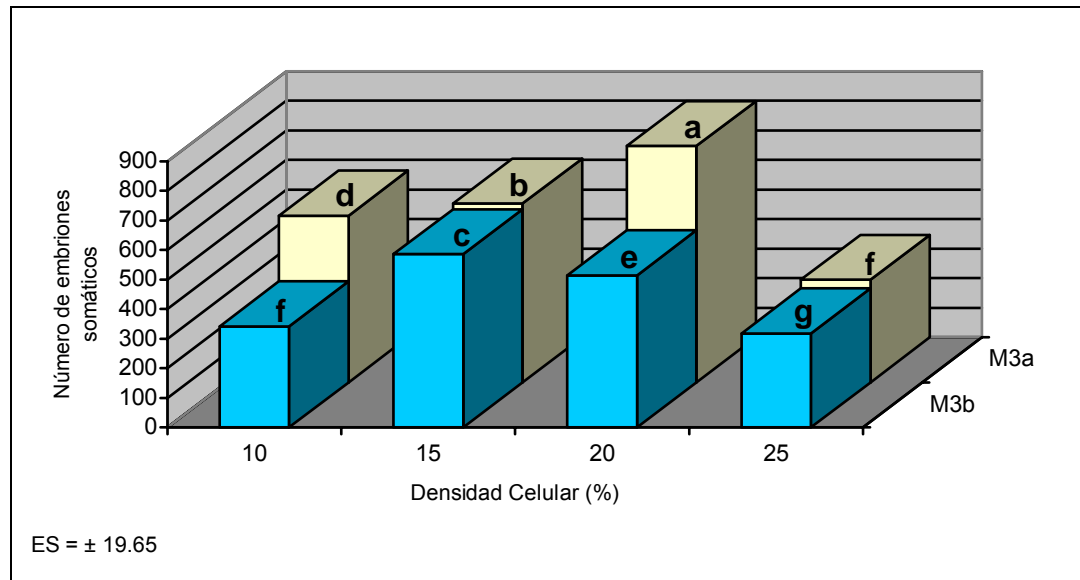


Figura 8. Embriones somáticos en etapa globular del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' en el medio de cultivo M3a semisólido a una densidad celular de 20%. (A) - A los 20 días de cultivo. (B) - A los 45 días de cultivo.

En este estudio hubo interacción entre ambos factores estudiados. El mejor tratamiento resultó ser el medio de cultivo M3a con una densidad celular de 20%, donde se formó un promedio de 799.5 ± 3.8 embriones somáticos de 150 μ L de suspensión celular después de 45 días de



cultivo. Este tratamiento fue significativamente superior a los demás tratamientos. Aunque el comportamiento para ambos medios de cultivo fue similar, el mayor número de embriones somáticos en el medio de cultivo M3b se formó al 15% de densidad celular (Figura 9).



Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan.

Figura 9. Número de embriones somáticos formados a los 45 días de cultivo a diferentes densidades celulares en dos medios de cultivo distintos. M3a – medio de cultivo propuesto por Bieberach (1995). M3b – medio de cultivo propuesto por Dhed'a *et al.* (1991).

En cuanto a los medios de cultivo estudiados, el M3a contenía las sales SH (1972), junto con otros componentes y reguladores del crecimiento como el ácido naftalenacético (ANA), isopenilaminopurina (2ip) y kinetina, los cuales lo hicieron mucho más rico en su composición que el M3b. Estos elementos (reguladores de crecimiento) favorecen el proceso de la histodiferenciación de las células, sin embargo, el medio de cultivo M3b fue un medio mucho más simple, ya que solo tenía la mitad de las sales MS y sin regulador del crecimiento. Otro aspecto que pudiera influir en los resultados de este experimento es que el medio de cultivo M3a tenía 45 g.L^{-1} de sacarosa, mientras que el M3b solo tenía 30 g.L^{-1} . Al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, aumenta el potencial osmótico, lo cual creó



una condición de estrés que sirvió para anular o alterar la expresión del gen relacionado a una función específica en la planta y que sea competente a las señales inductivas para la formación de los embriones somáticos (Schoofs, 1997). También la sacarosa sirvió como una fuente de energía para la formación de los embriones somáticos.

Por otra parte, a mayor densidad celular, mayor competencia entre las células por los elementos nutritivos en el medio de cultivo. También las células compiten por el espacio para su desarrollo. Estos factores pudieran ser probablemente la causa de la disminución del número de embriones formados a una densidad celular de 25% (Georget *et al.*, 2000). De Vries *et al.* (1988) plantearon la acumulación, en el medio de cultivo, de moléculas inhibitorias del proceso de diferenciación, como son las glicoproteínas extracelulares; también plantearon un desbalance en el medio de cultivo entre los niveles de elementos inhibitorios que han sido secretados por la célula al medio de cultivo.

Cabrera (2001) planteó que a partir del decimoquinto día de cultivo comenzaron a formarse pequeñas estructuras globulares en el cultivar 'Navolean' (*Musa* sp. AAB) donde en las diferentes densidades estudiadas se observó la formación de embriones somáticos en etapa globular, con los mayores números de embriones somáticos en densidades celulares entre 9.0 y 15.0% de VCS. En la densidad de 12.0% de volumen final de células se obtuvo el mayor número de embriones somáticos formados ($1\ 533 \pm 45.86$) después de 45 días de cultivo. Barranco (2000) obtuvo en el cultivar de 'Gran Enano' los mejores resultados con 15% de densidad celular, con $2\ 561.5 \pm 95.3$ embriones somáticos en medio de cultivo líquido y 219.5 ± 9.0 en medio de cultivo semisólido a partir de 1.0 mL de células. Gómez *et al.* (2002), a partir de la misma cantidad de suspensión celular, obtuvieron $1\ 883 \pm 23$ embriones somáticos en etapa globular después de 30 días de cultivo. Estos estudios se realizaron en medio de cultivo líquido en el cultivar híbrido 'FHIA-18' (*Musa* sp. AAAB).



Según Georget *et al.* (2000), en suspensiones celulares embriogénicas de plátanos, el desarrollo de células embriogénicas en pro-embriones en medio de cultivo líquido es bajo y dentro de las señales que resultan en la formación de embriones somáticos, la densidad celular es considerada un factor importante.

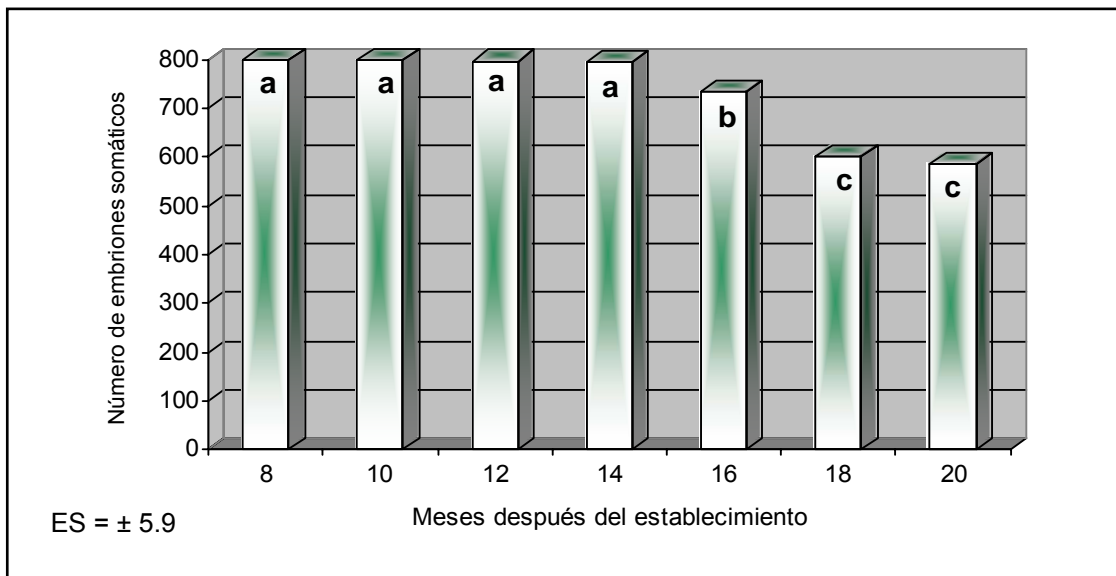
Côte *et al.* (1996) señalaron que los primeros embriones fueron discernibles entre los 20 y 30 días, después que la suspensión fue plaqueada sobre el medio de cultivo. El número promedio de embriones formados por mililitro fue $370 \times 10^3 \pm 65 \times 10^3$. Los resultados obtenidos en este trabajo, coinciden con los alcanzados por estos autores; se muestra que es posible obtener el mayor número de embriones somáticos globulares, en el medio de cultivo M3a semisólido y a una densidad celular de 20% en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21', con el empleo de suspensiones celulares embriogénicas.

Efecto de la edad de la suspensión celular sobre su estado embriogénico

La edad de la suspensión celular influyó sobre su potencial de diferenciación y su capacidad de formar embriones somáticos. Se mantuvo la suspensión celular del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' con 3.0 mg.L^{-1} de 2,4-D en el medio de cultivo y los subcultivos se realizaron cada 12 días. Se observa por la figura 10 que la máxima capacidad en la formación de embriones somáticos se mantuvo hasta los 14 meses en suspensión. A partir de los 16 meses de cultivo, la capacidad de formar embriones somáticos de estas suspensiones celulares disminuyó con diferencia significativa a las suspensiones celulares más jóvenes. La capacidad de estas suspensiones celulares siguió disminuyendo a los 18 y 20 meses de edad, donde solo se formaron 584.7 ± 5.87 embriones somáticos a partir de $150 \mu\text{L}$ de suspensión celular a 20% VCS.



Estos resultados pudieran deberse a la habituación de los agregados celulares en un medio de cultivo líquido con 3.0 mg.L^{-1} de 2,4-D, el cual puede provocar variaciones genéticas después de tiempo de cultivo prolongado (Gómez, 1998).



Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Dunnett's C.

Figura 10. Número de embriones somáticos en la etapa globular, formados a los 45 días de cultivo con suspensiones celulares a diferentes edades, después de haber sido establecidas en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

Côte *et al.* (1996) y Barranco (2001) mantuvieron suspensiones celulares de 'Gran Enano' y 'FHIA-18' respectivamente durante 20 meses después de haber sido establecidas, sin embargo, estos autores no comprobaron la capacidad de diferenciación de estas suspensiones con esta edad.

Schoofs (1997) planteó que la capacidad morfogénica de suspensiones celulares embriogénicas en diferentes cultivares de *Musa* no fue igual, lo cual indica que el genotipo influye en la respuesta embriogénica. Pérez (1998) señaló que las variaciones más comunes en el cultivo *in vitro* son la poliploidía, la aneuploidía y las aberraciones cromosómicas y en los



estudios citológicos en varios cultivos ha quedado demostrado que los cambios aumentan proporcionalmente a la edad de los cultivos *in vitro*. Se ha señalado que ésta es la causa fundamental de la pérdida de la totipotencia de las células, producto del elevado número de mutaciones en las células, pues solo se convertirán en plantas, las células con pequeños cambios genéticos (Pérez, 1998).

Es importante determinar el momento en que las suspensiones celulares pierden sus capacidades embriogénicas, ya que esto pudiera indicar la presencia de variaciones somaclonales, las cuales pueden ser un estorbo en cualquier programa de mejoramiento genético (Pérez *et al.*, 1998).

Basado en los resultados obtenidos en este estudio, se utilizaron suspensiones celulares con edad máxima de 14 meses para la regeneración de plantas, así como para ser transformadas genéticamente vía biobalística.

4.1.4. MADURACIÓN Y GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS.

La densidad celular y los días de permanencia en el medio de cultivo M4 influyeron en el inicio de la germinación de los embriones somáticos, sin embargo, no hubo interacción entre ambos factores. Los embriones somáticos formados a 15 y 20% de densidad celular, germinaron primero y con diferencia significativa a los formados a 10 y 25% (Tabla 6).

Tabla 6. Días de inicio de la germinación de los embriones somáticos formados a diferentes densidades celulares en el cultivar híbrido de plátano ‘FHIA-21’.

Densidad Celular (%)			
10	15	20	25
25.97 ± 1.1 b	20.42 ± 1.4 a	21.50 ± 1.1 a	26.27 ± 1.1 b

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Dunnett's C.



Estos resultados se pudieran atribuir a una mayor acumulación de sustancias de reservas de los embriones somáticos formados a 15 y 20% de densidad celular, los cuales estaban en mejores condiciones para enfrentar esta etapa de germinación a pesar de los días de permanencia en el medio de cultivo de maduración (M4).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que existe una relación entre la densidad celular, la formación de los embriones somáticos y el inicio de la germinación de los mismos, posiblemente debida a la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento en las concentraciones demandadas por las células en cada momento.

El tiempo de permanencia en el medio de cultivo M4 tuvo influencia en el inicio de la germinación. Los embriones somáticos que permanecieron en el medio de cultivo M4 de 20 a 30 días, germinaron primero, con diferencia significativa con los que permanecieron 10 días solamente, así como el control que no pasó por la etapa de maduración (Tabla 7).

Tabla 7. Días de inicio de la germinación de los embriones somáticos con diferente tiempo de permanencia en el medio de cultivo M4 en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Días de permanencia en el medio de cultivo M4			
0	10	20	30
33.57 ± 0.6 c	24.87 ± 0.8 b	17.97 ± 0.7 a	17.75 ± 0.7 a

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Dunnett's C.

Pocos autores hacen referencia a la etapa de maduración en el género *Musa* debido que al obtener embriones somáticos en etapa globular inmediatamente se pasan a medios de cultivo de germinación, donde hay mayor demora en cuanto a la germinación y bajos porcentajes de la misma (Schoofs, 1997). Los resultados de este estudio demuestran la influencia positiva del medio de cultivo de maduración en el inicio de la germinación.



Cabrera (2001) demostró que en el cultivar 'Navolean' (AAB) es indispensable colocar los embriones somáticos en etapa globular por 30 días en el medio de cultivo de maduración para lograr buenos resultados en la germinación. Al dejar los embriones somáticos menos tiempo, se demora mucho más la iniciación de germinación.

La densidad celular y el tiempo de permanencia en el medio de cultivo M4 influyeron y con interacción entre ambos en los números de embriones somáticos germinados. Los mejores tratamientos fueron con los embriones somáticos formados a 15% densidad celular después de 20 y 30 días de permanencia en el medio de cultivo M4, con 16.3 y 16.5 embriones somáticos de un total de 20 (Tabla 8), los cuales representan el 81.5 y 82.5% respectivamente. Estos dos tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos. Todos los embriones somáticos que permanecieron en el medio de cultivo M4 durante 20 y 30 días, independientemente de la densidad celular a que se formaron, tuvieron un comportamiento superior con diferencia significativa con respecto al control (Tratamiento 1-4). Esto comprobó la importancia que tiene la etapa de maduración para lograr altos porcentajes de germinación.

La densidad celular a que se formaron los embriones somáticos en el medio de cultivo M3a jugó un papel fundamental en la germinación. En la etapa de la formación de embriones somáticos, se concluyó que se formaron mayores números de embriones somáticos a una densidad celular del 20%, sin embargo, se demuestra en la etapa de germinación que los embriones somáticos formados a 15% lograron mayores números de embriones somáticos, germinados después de 20 y 30 días de permanencia en el medio de cultivo M4 (Tabla 8).



Tabla 8. Número de embriones somáticos germinados a diferentes densidades celulares y tiempo de permanencia en el medio de cultivo M4 en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Densidad celular (%)	Días de permanencia en el medio de cultivo M4			
	0	10	20	30
10	1.3 ± 0.30 d	2.2 ± 0.46 d	8.3 ± 0.59 c	8.8 ± 0.54 c
15	1.8 ± 0.35 d	7.0 ± 1.06 c	16.3 ± 0.47 a	16.5 ± 0.56 a
20	2.3 ± 0.36 d	8.4 ± 0.54 c	12.5 ± 0.68 b	12.9 ± 0.60 b
25	1.0 ± 0.33 d	2.7 ± 0.51 d	7.3 ± 0.68 c	8.6 ± 0.83 c

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Dunnett's C.

Côte *et al.* (1996) plantearon que el porcentaje de germinación en el cultivar 'Gran Enano' depende del tamaño de los embriones somáticos. Los que medían de 100 a 250 μm de longitud, lograron un porcentaje promedio de 3.0% y los que medían de 800 a 1 000 μm , un 20% de germinación.

El incremento en el peso seco y el engrosamiento de los embriones somáticos puede indicar una alta calidad en el vigor, lo cual influye positivamente en su posterior germinación (Fuji *et al.*, 1990).

Dhed'a *et al.* (1991) señalaron porcentajes de germinación de 10 a 23% en el cultivar 'Bluggoe' (ABB) cultivado de meristemo, mientras que Novak *et al.* (1989) mencionaron de 1.5 a 12% en bananos y banano de cocción cultivado de rizomas. Marroquín *et al.* (1993) lograron porcentaje de germinación de 20 a 36% en *Musa acuminata*. Mientras que Grapin *et al.* (1996a) obtuvieron en el plátano 'French Sombre' (AAB) porcentajes de germinación de 10 a 40%. Estos resultados son bajos en comparación con los que han logrado autores como Escalant *et al.* (1994) en



diferentes cultivares y Navarro *et al.* (1997) en *Musa acuminata*, quienes obtuvieron entre 60 y 70% de germinación en un sistema de inmersión temporal (SIT) tipo RITA.

Los trabajos más recientes de germinación de embriones somáticos en el género *Musa* corresponden a los realizados por Barranco (2001), quien logró hasta 40.6% de germinación en el cultivar híbrido 'FHIA-18' en medio de cultivo semisólido; y Cabrera (2001) en el cultivar 'Navolean' (AAB) con un 49.33%. Los resultados obtenidos en este trabajo son muy superiores a los de estos autores. Esto indica que el genotipo influye también en el proceso de la germinación.

Los embriones somáticos en etapa globular no están aptos para lograr altos porcentajes de germinación y por tanto necesitan ser colocados en el medio de cultivo M4 durante 20 días para favorecer la maduración de los mismos. Los resultados alcanzados en el epígrafe 4.1.3 revelaron que se formó el mayor número de embriones somáticos a una densidad celular de 20% en el medio de cultivo M3a. Basado en este análisis, se seleccionó el 15% de densidad celular para la formación de embriones somáticos ya que con esta densidad se garantiza una mejor eficiencia de regeneración de plantas.

4.1.5. CONVERSIÓN DE LAS PLANTAS OBTENIDAS DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS.

La habilidad de obtener plantas *in vitro* con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Fuji *et al.*, 1990). A los 50 días de plantadas en la fase de aclimatización, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre las dos poblaciones de plantas estudiadas (Tabla 9).

Las plantas obtenidas de embriogénesis somática y organogénesis tuvieron una supervivencia en esta fase de 99.2 y 99.6% respectivamente. Las plantas de ambas procedencias en este



estudio tenían características fenotípicas normales de acuerdo a lo planteado por Rowe (1998) para este cultivar híbrido de plátano.

Tabla 9. Comportamiento en la fase de aclimatización de plantas obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas
Embriogénesis somática	16.66 ± 0.32	6.64 ± 0.19
Organogénesis	15.78 ± 0.39	6.78 ± 0.21

Durante el desarrollo de las plantas en la fase de aclimatización hasta los 50 días (Figura 11), no se observaron cambios morfológicos, tales como la coloración de las hojas y el pseudotallo. Esto no excluye la existencia de variación genética en estas poblaciones, sino que en esta fase no fue posible detectarla. Sandoval *et al.* (1997) señalan que se puede detectar alrededor de 60% de variantes somaclonales en dicha fase de crecimiento y que se hace necesario las evaluaciones de estas plantas en campo hasta completar el ciclo de desarrollo por dos generaciones.



Figura 11. Aspecto fenotípico de las plantas del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' procedentes de **(A)** organogénesis y de **(B)** la embriogénesis somática, a los 50 días de plantadas en la fase de aclimatización.



Se observó un buen vigor y crecimiento en ambas poblaciones, el cual puede estar dado por el rejuvenecimiento y el saneamiento que se obtiene a través del cultivo *in vitro* (Pérez, 1998). Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que no existen diferencias morfológicas entre ambas técnicas de propagación masiva de plantas hasta esta fase de desarrollo.

Côte *et al.* (2000) encontraron variaciones en plantas del cultivar 'Gran Enano' obtenidas de embriones somáticos durante la fase de aclimatización. Estos cambios representaron entre 0.5 y el 2.0%. Cuando estas plantas fueron llevadas al campo, desaparecieron estos cambios morfológicos, demostrándose que eran producto de cambios epigenéticos. Barranco (2001) encontró en el cultivar híbrido 'FHIA-18' diferencias significativas en cuanto a la altura de las plantas procedentes de las dos vías de regeneración estudiadas, con valores superiores para las plantas originadas de embriones somáticos. El resto de los parámetros evaluados, se comportaron de igual manera. Cabrera (2001) realizó estudios similares en el cultivar 'Navolean' y observó que las plantas de ambas procedencias se comportaban de la misma manera sin diferencias significativas entre sí. Los resultados de este trabajo corroboran los obtenidos por este autor.

Los diferentes estudios realizados con el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' y los correspondientes resultados obtenidos en esta investigación permiten proponer un esquema (Figura 12) para la embriogénesis somática a partir de las flores masculinas inmaduras. Este sistema puede ser aplicado como una herramienta para la transformación genética de este cultivar híbrido de plátano, así como una vía de propagación masiva y conservación de germoplasma.

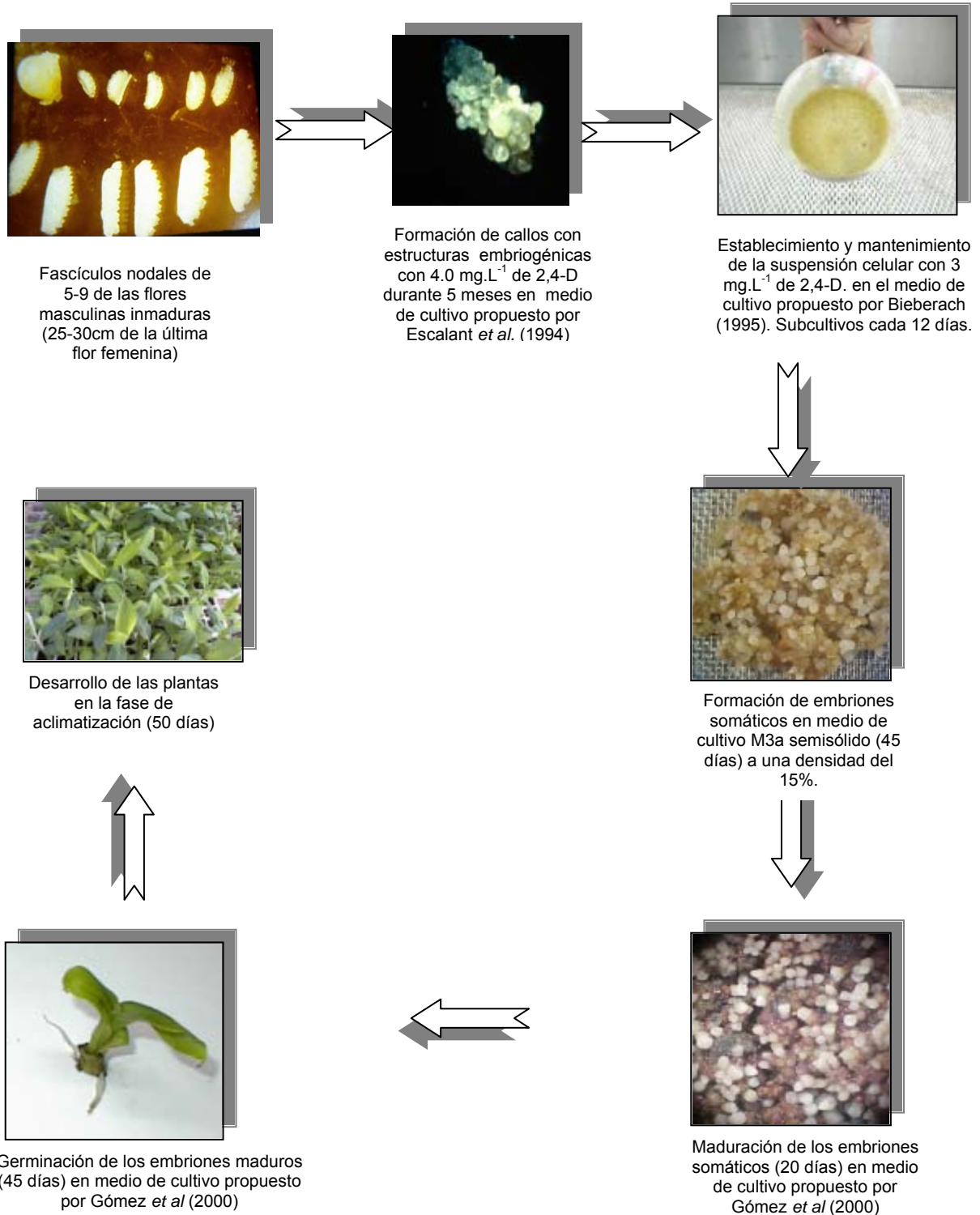


Figura 12. Esquema para el desarrollo de la embriogénesis somática hasta la aclimatación de las plantas formadas, a partir de embriones somáticos en el cultivar híbrido de plátano ‘FHIA-21’ (*Musa* sp. AAAB).



4.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA POR BIOBALÍSTICA.

La transformación genética por biobalística es muy utilizada en varias especies por ser un método simple y versátil. A continuación se presentan los resultados obtenidos en varios estudios de parámetros que influyen en el proceso de la transformación genética por esta vía en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

4.2.1. ESTUDIO DE LA DISTANCIA Y LA PRESIÓN PARA EFECTUAR EL DISPARO SOBRE EL BLANCO BIOLÓGICO.

Los resultados de este experimento demostraron que la distancia y la presión juegan un papel muy importante en la expresión del gen reportero *uidA*, que codifica para la β -glucuronidasa (GUS) y es imprescindible ajustar estos factores antes de establecer un protocolo para la transformación genética del plátano. La mejor interacción de presión y distancia de disparo resultó ser la de 140 psi con 12 cm. Este tratamiento produjo 57.0 puntos azules con diferencia significativa a los demás tratamientos (Tabla 10). A 6.0 cm, es probable que las células sufrieran daños por el impacto de las micropartículas y la descarga de gas y la mayoría de ellas murieron.

Tabla 10. Número de puntos azules por disparo a diferentes distancias y presiones en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

Distancia de disparo (cm)	Presión (psi)			
	120	130	140	150
6	20.3 \pm 1.8 g	28.1 \pm 2.1 ef	23.6 \pm 1.9 fg	13.2 \pm 1.6 h
9	25.2 \pm 1.7 fg	39.7 \pm 2.7 c	45.7 \pm 1.5 b	23.5 \pm 1.7 fg
12	21.9 \pm 1.5 fg	36.8 \pm 2.4 cd	73.0 \pm 3.1 a	31.8 \pm 2.4 de
15	15.1 \pm 1.1 h	24.4 \pm 1.5 fg	39.8 \pm 2.7 c	36.6 \pm 2.3 cd

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan.



Una presión de 120 psi pudo haber resultado insuficiente para la penetración de las micropartículas en las células, obteniéndose una baja expresión de la β -glucuronidasa. Por otra parte, 150 psi fue una presión demasiado alta, con la cual se obtuvo también una baja expresión de la β -glucuronidasa, que pudiera ser la causa del daño celular por el impacto de las micropartículas (Becker *et al.*, 2000). Los resultados de este experimento corroboran el hecho de que la combinación de la presión y la distancia es fundamental para cada especie y cultivar.

La reacción de la enzima β -glucuronidasa con el sustrato X-Gluc conduce a la expresión del gen *uidA*, la cual se manifiesta por medio de un precipitado azul en las células (Figura 13), observado bajo el microscopio estereoscópico.



Figura 13. Expresión de la β -glucuronidasa en agregados celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

Más *et al.* (2000) obtuvieron los mejores resultados al bombardear embriones somáticos del cultivar 'Gran Enano' (*Musa* sp. AAA) con una presión de 120 psi y una distancia de 8.0 cm. Sági *et al.* (1995a) utilizaron presiones de 43 a 87 psi y lograron expresión transitoria en el cultivar 'Bluggoe' (*Musa* sp. ABB). En estos experimentos, los autores utilizaron una pistola construida basada en la descripción de Takeuchi *et al.* (1992) y con helio como el gas propulsor. En este trabajo se utilizó el argón y los resultados obtenidos indican, que aunque se clasifican



como un gas más pesado por su peso molecular, se puede utilizar para la transformación genética. No se encontró en la literatura consultada ningún artículo donde utilice este gas para la transformación genética de bananos y plátanos.

Los resultados de disparo varían en dependencia de la especie vegetal y del diseño de la pistola de genes (Rey *et al.*, 1996) entre otros factores. Becker *et al.* (2000) seleccionaron, para el bombardeo de suspensiones celulares en el cultivar 'Gran Enano', una distancia de 7.5 cm y una presión de 80 psi. Mientras que Grapin (1995) obtuvo sus mejores resultados a una distancia entre 10-13 cm en diferentes cultivares de *Musa spp.*

Taylor y Vasil (1991) describieron daños visibles a células de mijo (*Pennisetum glaucum* L.) cuando estas fueron colocadas más cerca al filtro en un aparato PDS-1000, sirviéndose de micropartículas de oro. Klein *et al.* (1988a) encontraron una distancia óptima de 6.0 cm para el bombardeo de células de *Zea mays* con una pistola de alta presión y plantearon que la unidad de expresión disminuye a medida que se incrementa la distancia entre las células y el acelerador de partículas. Según estos autores, los resultados obtenidos se deben a que la desaceleración de las micropartículas, causada por la resistencia del aire, aumenta a medida que aumenta la distancia.

Más (2002) determinó que la mejor presión y distancia para lograr la expresión transitoria de la β -glucuronidasa en embriones somáticos de la papaya (*Carica papaya* L.) fue 140 psi y 9.0 cm respectivamente y el argón como gas propulsor.

Seki *et al.* (1991) encontraron que la mejor presión para bombardear *Arabidopsis thaliana* L. fue de 75 psi, mientras que para cultivos como el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y *Betula pendula* la mejor presión fue de 200 psi. A una distancia fijada en 10 cm con una pistola neumática de alta presión, se alcanzaron los mejores resultados en las hojas de *Arabidopsis thaliana* a una



presión de 1635.68 psi, mientras que para las raíces de la misma especie, la mejor presión fue de 2844.66 psi. Esto corrobora una vez más que la especie, el cultivar y el tejido influye también en los resultados obtenidos, y por lo tanto requieren ser estudiados para su optimización.

Los resultados obtenidos en este estudio condujeron a la realización de los disparos a una presión de 140 psi y una distancia de 12 cm.

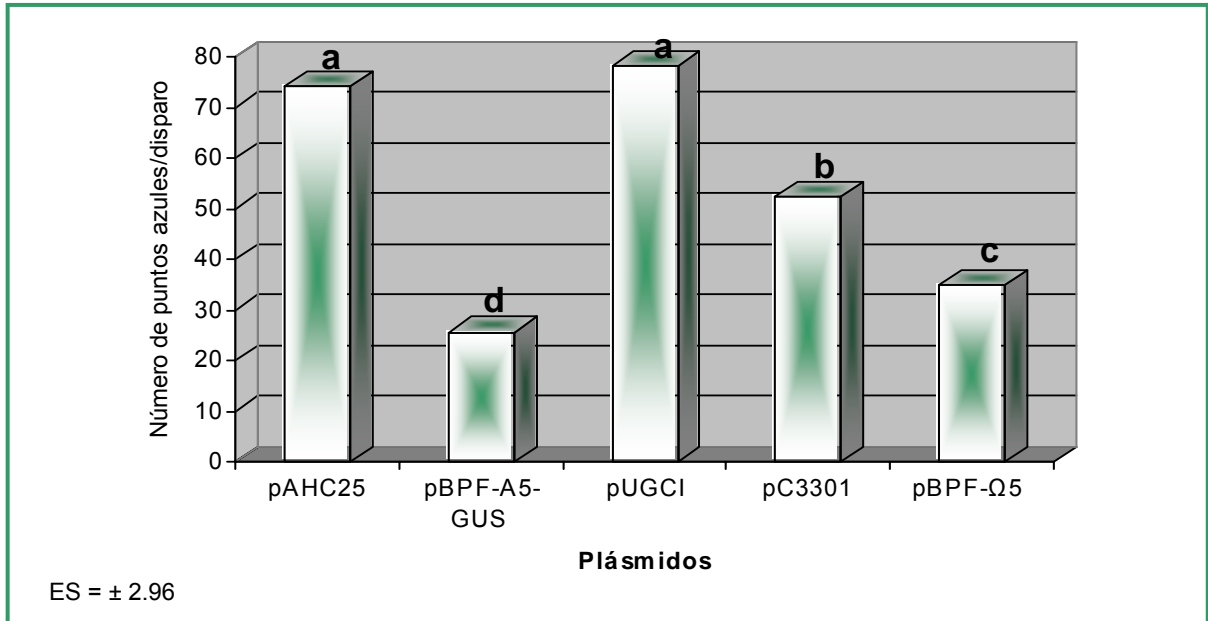
4.2.2. ESTUDIO DE DIFERENTES CONSTRUCCIONES GENÉTICAS.

Para cada especie de planta y cada tipo de tejido, es necesario identificar los promotores altamente expresivos. Este estudio se realizó para analizar el efecto de diferentes plásmidos con diferentes promotores, ya que estos juegan un papel fundamental en la introducción e integración del transgen en el genoma de la planta. Los plásmidos que produjeron la mayor cantidad de puntos azules por disparo fueron pUGCI y pAHC25. Estos plásmidos se comportaron significativamente superiores a los demás plásmidos. Estos resultados se pudieran atribuir al hecho de que los plásmidos están bajo el control del promotor, el poliubiquitina del maíz, el cual ha sido reportado como uno de lo más fuerte en el género *Musa*. El resto de los plásmidos están bajo el control del promotor 35S CaMV. El plásmido de menor cantidad de puntos azules obtenido fue el pBPF-A5-GUS con diferencia significativa a los demás plásmidos (Figura 14).

Según Sági *et al.* (1995b) el promotor poliubiquitina del maíz es uno de los promotores más fuertes para *Musa* spp. Estos autores obtuvieron los mejores resultados con el plásmido pAHC27 bajo el control del mismo promotor en diferentes cultivares de *Musa* spp. Los resultados de este trabajo corroboran lo planteado por estos autores. Schenk *et al.* (1999) utilizaron un nuevo promotor (ScBV) en el bombardeo de células embriogénicas de los cultivares 'Williams' (AAA), 'Three Hand Planty' (AAB) y 'Gran Enano' (AAA) y encontraron que



los niveles de expresión fueron variables para diferentes líneas transgénicas, pero en general, fue comparable con las actividades de los promotores poliubiquitina del maíz y 35S CaMV.



Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan.

Figura 14. Eficiencia de transformación con cinco plásmidos diferentes en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa sp.* AAAB).

Grabin (1995) estudió diferentes plásmidos en cultivares como 'French Sombre' (AAB), 'Gran Enano' (AAA) y *M. malaccencis* (AA) y encontró que en todos los casos el mejor fue el pUGCI, lo cual coincide con los resultados alcanzados en este trabajo.

El promotor 35S CaMV ha sido usado extensamente con éxito en muchas especies de plantas, algunas veces como un promotor doble o triple para aumentar la expresión génica (Charest *et al.*, 1993). Estos autores encontraron niveles más altos de expresión GUS en *Picea glauca* cuando un promotor doble de 35S CaMV fue vinculado al *enhancer* del virus del mosaico de la alfalfa. Christensen *et al.* (1992) plantearon que mientras el promotor 35S CaMV funciona bien en la mayoría de los dicotiledóneas, tiene algunas limitaciones y no puede ser tan efectivo en monocotiledóneas.



El uso del promotor *Adh 1* del maíz y su primer intron en células de maíz, resultó en un aumento en la expresión génica comparado al promotor 35S CaMV solo (Reggiardo *et al.*, 1991). Taylor *et al.* (1993) investigaron el uso del promotor, primer exon y primer intron del gen ubiquitina del maíz en varias monocotiledóneas, tales como el trigo, el maíz, *Panicum maximum*, *Pennisetum glaucum*, *P. Purpureum* y *Saccharum officinarum*. En todos los casos, el plásmido con el promotor la ubiquitina resultó en niveles más altos de expresión GUS que el promotor *Adh 1* con el intron 1 del *Adh 1*. Esta observación fue apoyada por Christensen *et al.* (1992), quienes encontraron un aumento de diez veces en la expresión del gen reportero *cat* cuando fue conducido por el promotor *Ubi 1*, comparado con el promotor 35S CaMV.

Grapin *et al.* (1996b) examinaron seis promotores diferentes para la expresión transitoria y las actividades de estos fueron similares. Altos niveles de expresión transitoria del gen *uidA* fueron obtenidos en las suspensiones celulares de 'Gran Enano' (AAA), después de mejorar los parámetros de bombardeo.

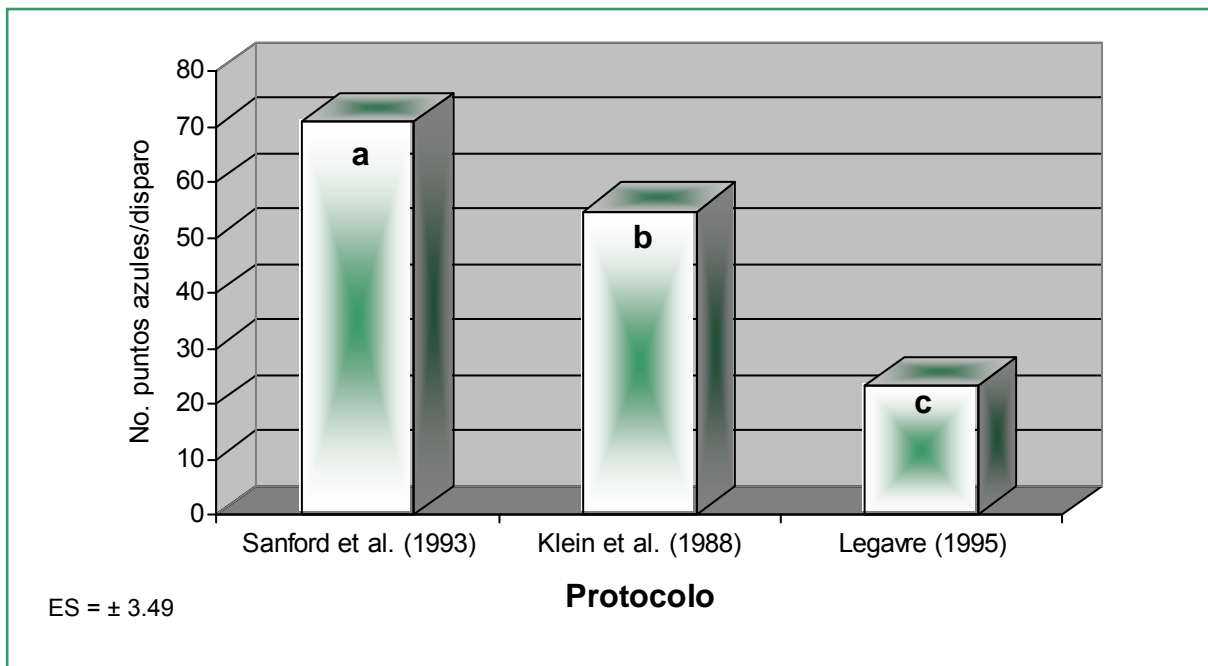
El tamaño del plásmido también puede influir en la expresión génica. Grandes plásmidos (más de 10 kb) puede ser más sensibles a la fragmentación durante el bombardeo de microprojectiles (Fitch *et al.*, 1992), provocándose niveles más bajo de expresión génica. En esta investigación el tamaño no fue un factor de estudio, ya que todos los plásmidos utilizados tuvieron tamaño menor de 10 kb. En este estudio en particular, el promotor, específicamente el poliubiquitina del maíz, jugó un papel importante en los números de puntos azules obtenidos por disparo.

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que los plásmidos bajo el control del promotor poliubiquitina del maíz lograron mayores eficiencias de transformación con respecto a los plásmidos con el promotor 35S CaMV, y por lo tanto debe ser considerado para la transformación genética de este cultivar híbrido de plátano en estudio.



4.2.3. ENSAYO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EL RECUBRIMIENTO DE LAS MICROPARTÍCULAS.

La adhesión eficiente del ADN a la superficie de las micropartículas es esencial para su entrega óptima. Muchos protocolos han sido descritos para el recubrimiento de las micropartículas. Al ensayar tres protocolos diferentes, se obtuvo que el uso del CaCl_2 y la espermidina (Sanford *et al.*, 1993 y Klein *et al.*, 1988a) es importante para lograr mayor efectividad en la expresión génica. Los dos protocolos que usaron el CaCl_2 y la espermidina lograron mayores números de puntos azules que el protocolo de Legavre (1995) (Figura 15). Este resultado se pudiera atribuir al papel que juega el cloruro de calcio y la espermidina en la adhesión de la ADN sobre la micropartículas.



Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan.

Figura 15. Número de puntos azules por disparo en agregados celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' con el empleo de tres protocolos de recubrimiento diferentes.



Carrasco (1999) planteó que en presencia de CaCl_2 y espermidina, el ADN queda adherido a las micropartículas metálicas por interacciones no covalentes y una vez dentro del tejido vegetal, el ADN se desprende de las micropartículas debido a las modificaciones del entorno iónico.

Cao *et al.* (1990) realizaron investigaciones con respecto a los cambios en los componentes de la mezcla de las micropartículas y el ADN. Ellos compararon el uso de cloruro de calcio y espermidina, polietilenglicol (PEG) solo y PEG en combinación con espermidina adheridos a partículas de tungsteno. El uso de PEG en combinación con espermidina resultó en la mayor expresión de GUS observada dos días después de bombardear secciones de embriones cigóticos maduros de arroz y maíz. Por otra parte, Perl *et al.* (1992) encontraron que cuando utilizaron el gen *uidA* en trigo, se observaron el mayor número de unidades de expresión cuando la espermidina fue omitida del protocolo descrito por Klein *et al.* (1988a).

Panis *et al.* (1996) plantearon que el método más aplicado para el recubrimiento de las micropartículas con el ADN es el propuesto por Sanford *et al.* (1993) y los resultados alcanzados en el presente trabajo coinciden con lo planteado por estos autores.

4.2.4. ESTUDIO DE LA CANTIDAD DE MICROPARTÍCULAS Y NÚMERO DE DISPAROS.

Este experimento se realizó para continuar el ajuste de los parámetros que influyen en el proceso de la transformación genética vía biobalística. Del proceso estadístico resultó que la cantidad de micropartículas y el número de disparos no interactuaron para influir sobre los resultados, sólo este último factor mostró su efecto sobre los agregados celulares. Al realizar un solo disparo, se obtuvieron valores significativamente superiores a los tratamientos con dos disparos sobre el mismo blanco (Tabla 11). Dos disparos sobre la misma muestra tuvieron un efecto negativo. Esto se pudiera atribuir al hecho de que las células sufrieron mucho daño al ser bombardeadas dos veces, ya que las micropartículas de tungsteno son de forma irregular con



puntas, las cuales causan daños a las células vegetales, que en muchos casos es irreversible. Los daños causados por el impacto de las micropartículas pueden provocar la muerte de las células (Escalant, 2002).

Tabla 11. Efecto del número de disparo por muestra sobre agregados celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Número de disparos	Número de puntos azules
1	70.53 ± 4.04 a
2	31.40 ± 2.56 b

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Dunnett's C.

La cantidad de micropartículas usada para efectuar los disparos no influyó sobre los resultados alcanzados. Esto pudiera deberse a que 0.42 mg (7.0 μ L) fue suficiente para penetrar la cantidad de células utilizada para cada disparo. El aumento de la cantidad de micropartículas hasta 0.66 mg (11.0 μ L), no causó un incremento significativo en la eficiencia de la transformación.

Sági *et al.* (1995a) indicaron que el doble bombardeo sobre suspensiones celulares del cultivar 'Bluggoe' (*Musa* sp. ABB) mejoró la frecuencia de expresión transitoria, con un promedio de 494 ± 60.3 puntos azules por muestra, sin embargo, estos autores utilizaron micropartículas de oro, el cual es inerte y no es tóxico. El genotipo pudiera marcar una diferencia en los resultados obtenidos en el género *Musa*, así también el tipo de pistola de genes que se utiliza para efectuar los bombardeos. Becker *et al.* (2000) utilizaron 0.42 mg (5.0 μ L) de micropartículas para cada disparo sobre suspensiones celulares del cultivar 'Gran Enano' (*Musa* sp. AAA) lográndose buenos resultados. Con el empleo de embriones somáticos en la etapa globular del mismo cultivar, Más *et al.* (2000) lograron las mayores eficiencias al efectuar dos disparos sobre



la misma muestra y con 12 μL de suspensión de micropartículas, sin embargo, estos son tejidos más diferenciados y necesitan de mayor fuerza para la penetración de las micropartículas.

Las frecuencias de transformación pueden aumentar, no solo por cambiar la velocidad de las partículas, sino también por realizar bombardeos repetidos (Southgate *et al.*, 1995). Lonsdale *et al.* (1990) encontraron que dos bombardeos aumentaron la expresión transitoria del gen *uidA* introducido en embriones de trigo, aunque los bombardeos siguientes ocasionaron mayor daño al tejido. Klein *et al.* (1988a) reportaron un aumento en los eventos de transformación en suspensiones celulares de maíz al realizar tres bombardeos sucesivos. Contrario a estos autores, Kartha *et al.* (1989) encontraron que el doble bombardeo de suspensiones celulares y embriones inmaduros de cebada fue perjudicial, lo cual coincide con los resultados alcanzados en este trabajo. Esto se pudiera atribuir al estado en que se encuentre el blanco biológico.

Klein *et al.* (1988a) observaron que la expresión GUS llegó a su punto más alto cuando pequeñas cantidades (1.25 ó 2.50 μL) de micropartículas fueron usadas en el bombardeo del maíz, mientras que volúmenes de 5.0 ó 10.0 μL ocasionaron una reducción drástica en el número de unidades de expresión observadas.

Más (2002) encontró que la frecuencia de aparición de puntos azules aumentó al disparar embriones somáticos de papaya con 12 μL de la suspensión de micropartículas, sin embargo, al incrementar la cantidad de micropartículas a 16 μL la eficiencia del disparo disminuyó, lo cual pudiera estar dado por la afectación de la vitalidad del tejido debido al exceso de partículas de tungsteno sobre el mismo. Esta misma autora no encontró diferencia estadística entre uno y dos disparos sobre la misma muestra.

Franche *et al.* (1991) dispararon tres veces las hojas de yuca (*Manihot esculenta*) a una distancia de 4.0 cm. El tejido utilizado para realizar los disparos también influyó en los



resultados. Las hojas son tejidos más diferenciados y resisten más los impactos de las micropartículas que las células en suspensión.

Sanford *et al.* (1993) sugirieron que las partículas de tungsteno eran potencialmente tóxicas a ciertos tipos de células, las cuales podían dañarse mediante su acción directa o por medio de la acidificación del medio de cultivo. Russell *et al.* (1992) observaron toxicidad de las partículas de tungsteno sobre suspensiones celulares de tabaco, por lo que al duplicar el disparo sobre la misma muestra, aumenta la cantidad de tungsteno y esto pudiera incrementar su toxicidad sobre los agregados celulares del 'FHIA-21' en el presente estudio, afectándose por consiguiente la eficiencia de transformación.

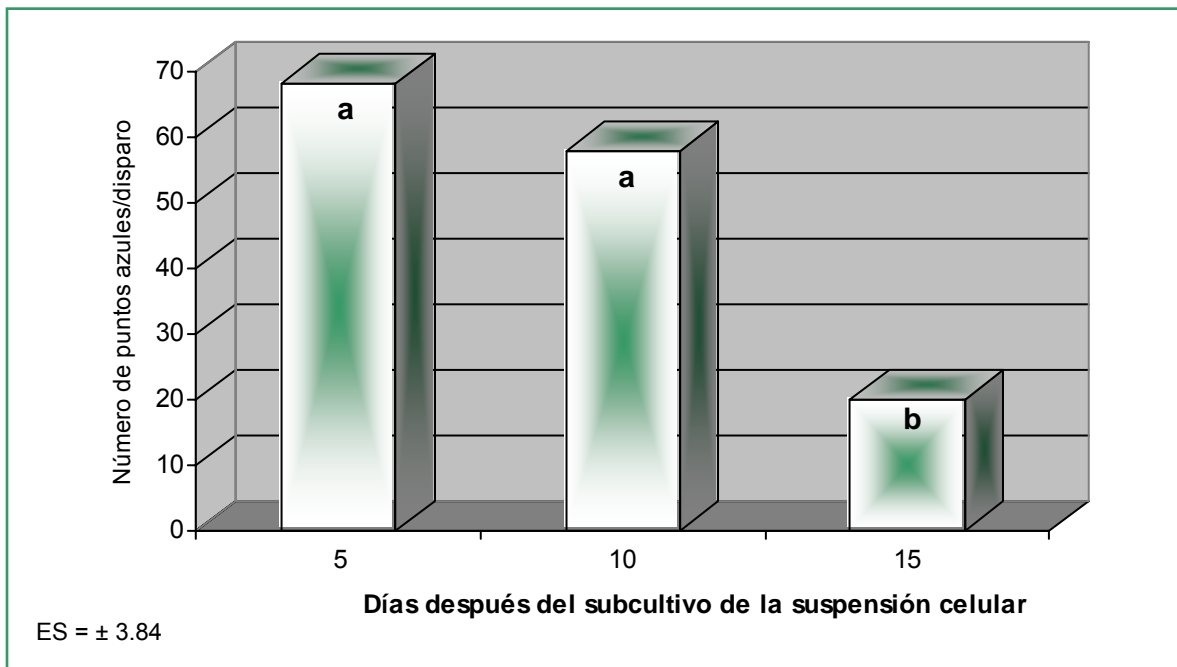
Por las revelaciones de este estudio, se realizó un solo disparo por muestra con 0.42 mg (7.0 μ L) de micropartículas.

4.2.5. EFECTO DEL TIEMPO DESPUÉS DEL SUBCULTIVO DE LA SUSPENSIÓN CELULAR SOBRE LA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN.

Se ha demostrado en este experimento que el tiempo después del subcultivo de la suspensión celular es muy importante e influye en los resultados finales. Al utilizar suspensiones celulares de cinco y diez días de edad después del último subcultivo, se observaron valores de 68.13 y 57.93 puntos azules por disparo respectivamente, sin diferencia significativa entre ellos. Los agregados celulares recolectados 15 días después del último subcultivo solo produjeron un valor de 20.06 puntos azules por disparo, el cual fue significativamente inferior al resto de los tratamientos (Figura 16). Este resultado pudiera atribuirse a que las suspensiones celulares de 15 días de edad ya no están en su fase logarítmica de crecimiento y las células no estaban en división activa, como se mostró en el epígrafe 4.1.2.



Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los de Sági *et al.* (1995a), quienes estudiaron la edad de 4, 5 y 6 días después del subcultivo en el cultivar 'Bluggoe' (*Musa sp.* ABB) y al hacer la tinción con el sustrato dos días después del bombardeo. Estos autores lograron los mejores resultados con los tratamientos de 5 y 6 días. Becker *et al.* (2000) utilizaron células recolectadas cuatro días después del subcultivo en el cultivar 'Gran Enano'.



Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Dunnett's C.

Figura 16. Efecto de la edad de la suspensión celular después del último subcultivo en la eficiencia de la transformación en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa sp.* AAAB)

Remy *et al.* (2002) enfatizaron sobre la importancia de efectuar los disparos cuando los agregados celulares de diferentes cultivares de *Musa spp.* aún están en la fase logarítmica de crecimiento, ya que logró mayores eficiencia de transformación al utilizar agregados celulares recolectados de 5 a 8 días después del último subcultivo.

Cabrera-Ponce *et al.* (1995) plantearon que la edad y las características de crecimiento de los callos embriogénicos en la papaya utilizados para el bombardeo de partículas, probablemente son los factores más importantes para lograr altas eficiencias de transformación.



McCown *et al.* (1991) sugieren que el mantenimiento de la división celular puede ser ventajoso para la integración de genes foráneos en el genoma de los tejidos blancos.

Con el subcultivo de los embriones somáticos tres días antes del disparo se incrementó el número de puntos azules en el cultivo de la papaya (Más, 2002). Son varios investigadores que destacan la incidencia del estado biológico del tejido sobre la eficiencia de la transformación y la calidad de las plantas transgénicas obtenidas (Yibrah *et al.*, 1994; Mahon *et al.*, 1996). Estos últimos autores estudiaron el efecto del régimen de cultivo antes del bombardeo de embriones somáticos y cigóticos de papaya de una variedad australiana y obtuvieron que el número de días de subcultivo anterior al evento de transformación, presentó un marcado efecto sobre la eficiencia del proceso para ambos tipos de explantes.

Seki *et al.* (1991) indicaron que el tiempo de cultivo es un factor fundamental en el proceso de transformación genética y que depende del tipo de tejido a disparar e incluso de la especie. Estos investigadores utilizaron tiempos de dos y cuatro días antes de efectuar el bombardeo para el cultivo de hojas y raíces de *Arabidopsis*.

Ellis *et al.* (1993) sugirieron en *Picea glauca* que el estado de competencia para la transformación estaba en dependencia del estado de crecimiento. Iida *et al.* (1991) encontraron que la frecuencia de transformación se incrementó al transformar células de tabaco que se encontraban en el proceso de división celular; ellos refirieron incluso que la expresión transitoria en la fase G2 del ciclo celular es de dos a cuatro veces superior que en la S o G1. La fase de crecimiento logarítmico coincide con la etapa en que la mayor cantidad de células pasan a G2 (replicación y transcripción del ADN), y en efecto es en esta fase donde Sanford *et al.* (1993) describieron mejores eficiencias de transformación.



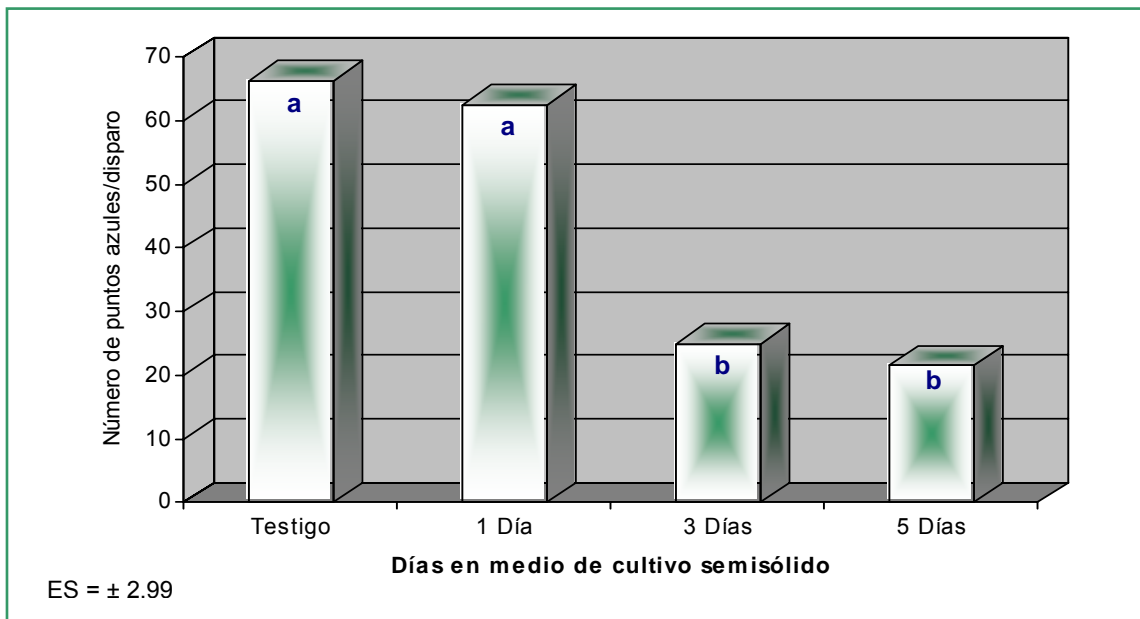
Por otra parte, Grapin (1995), al bombardear suspensiones celulares de banano, también obtuvo que la fase de crecimiento exponencial fue el período óptimo para realizar la transformación, lo cual confirmó lo planteado por Vasil *et al.* (1991) y Ritala *et al.* (1993). De esa manera, para los estudios posteriores en este trabajo, se utilizaron suspensiones celulares de 5 a 10 días después del último subcultivo para efectuar los bombardeos.

4.2.6. EFECTO DEL ESTADO FÍSICO DEL MEDIO DE CULTIVO Y EL TIEMPO DE PRECULTIVO DE LAS CÉLULAS ANTES DE LOS DISPAROS.

Muchos autores han planteado la realización de diferente tratamiento del blanco biológico antes de ser bombardeado. Este experimento reveló, sin embargo, que en el caso del cultivar híbrido de plátano utilizado en este estudio, no es necesario el precultivo de las células en medio de cultivo semisólido antes de los disparos para lograr mayores eficiencias de expresión transitoria del gen *uidA*. Al realizar los disparos sobre los agregados celulares cultivados 3 y 5 días en medio de cultivo semisólido, se observó mucha dispersión de los mismos tras el disparo. Esto pudiera deberse a que los agregados celulares cultivados en medio de cultivo semisólido, tenían la superficie de la pared celular más seca, la cual dificulta la penetración de las micropartículas. El testigo (agregados celulares recolectados de las suspensiones celulares) y el tratamiento de un día en medio de cultivo semisólido obtuvieron los mayores números de puntos azules por disparos. Estos dos tratamientos fueron significativamente superiores a los tratamientos de 3 y 5 días en el medio de cultivo semisólido antes del bombardeo (Figura 17). Estos resultados alcanzados demuestran que no es necesario un precultivo de las células en medio de cultivo semisólido para alcanzar óptimos resultados. Esto pudiera deberse a una disminución en la actividad mitótica de las células al cambiar el estado físico del medio de cultivo en que se desarrollan (Torres, 2002).



Becker *et al.* (2000) precultivaron las células del cultivar 'Gran Enano' (AAA) en el medio de cultivo semisólido propuesto por Côte *et al.* (1996) para el establecimiento y mantenimiento de las suspensiones celulares. Estos autores no estudiaron diferente tiempo de cultivo en el medio de cultivo semisólido, sino seleccionaron bombardear las células cuatro días después de estas condiciones de precultivo, lo cual es contrario a los resultados en este trabajo.



Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan.

Figura 17. Efecto del tiempo de precultivo de las células en medio de cultivo semisólido antes del bombardeo en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Christou (1995) planteó que la selección y naturaleza de los explantes y las condiciones de cultivo antes y después del bombardeo son factores que pueden determinar el éxito de los experimentos de bombardeo de partículas. Se ha demostrado también que el pre-tratamiento de los tejidos blancos es de mucha importancia (Vain *et al.*, 1993).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se utilizaron células recolectadas directamente de las suspensiones celulares embriogénicas para efectuar el bombardeo, ya que



con estas células se lograron mayores eficiencias en la transformación que con células pre-cultivadas en medio de cultivo semisólido antes del disparo.

4.2.7. DETERMINACIÓN DE LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DEL HERBICIDA 'BASTA' SOBRE LOS AGREGADOS CELULARES.

Los genes marcadores de selección son esenciales para la producción de plantas modificada genéticamente. Los marcadores más utilizados en este proceso son los que le confiere resistencia a antibióticos y a herbicidas, sin embargo, hay una preocupación relacionada con la transferencia de genes respecto a la resistencia a antibióticos para organismos patógenos (Enríquez, 2002).

A partir de los siete días en el medio de selección, se comenzó a observar el efecto del BASTA en los agregados celulares. Luego de la sexta semana de cultivo se observó un ennegrecimiento de las células, especialmente en los tratamientos con mayor concentración del herbicida. En el control, los agregados celulares crecieron y se multiplicaron sin afectaciones. A las ocho semanas de cultivo, durante las cuales se realizan la selección en el género *Musa* spp. (Panis *et al.*, 1996), se aprecia que la mínima concentración inhibitoria del herbicida BASTA es de 6.0 mg.L⁻¹ (Tabla 12). A esta concentración, todos los agregados celulares murieron después de ocho semanas de cultivo (Figura 18).

Grado	Descripción
1	Células muertas
2	Células vivas sin crecimiento
3	Células vivas con pequeñas zonas de crecimiento
4	Células vivas creciendo en un 50%
5	Células con crecimiento normal (100%)



Tabla 12. Efecto de la concentración del herbicida BASTA sobre los agregados celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Concentración del herbicida BASTA (mg.L ⁻¹)	Evaluación de acuerdo a la escala de grado propuesto por Santana (1982)					
	Sexta semana		Octava semana		Décima semana	
	Media real	Media de rango	Media real	Media de rango	Media real	Media de rango
0	5.0	41.5 c	5.0	44.0 c	5.0	44.5 c
2	4.6	36.1 c	4.3	37.0 bc	4.2	36.5 bc
4	3.8	28.7 bc	2.5	25.5 ab	2.4	24.5 ab
6	1.4	12.7 ab	1.0	10.5 a	1.0	11.0 a
8	1.0	8.5 a	1.0	10.5 a	1.0	11.0 a

Medias de rango con letras distintas en una columna difieren estadísticamente según Kruskal-Wallis para $p < 0.05$.

El modo de acción del herbicida BASTA consiste en que su ingrediente activo, fosfotricina (PPT), también conocido como glufosinato de amonio, es análogo al glutamato, el sustrato de la enzima glutamina sintetasa. Esta enzima cataliza la conversión de glutamato a glutamina y elimina el amonio tóxico de las células. Cuando se inhibe esta enzima, se produce la acumulación de amonio y la disrupción de la estructura del cloroplasto (Brasileiro y Aragão, 2001).

La concentración de la fosfotricina para el proceso de selección varía entre 1 y 100 mg.L⁻¹, la cual depende del tejido vegetal y la composición del medio de cultivo (Enríquez, 2002). Este autor regeneró plantas transgénicas resistentes al herbicida BASTA de papa y caña de azúcar con concentraciones de 2.0 y 4.0 mg.L⁻¹ respectivamente.

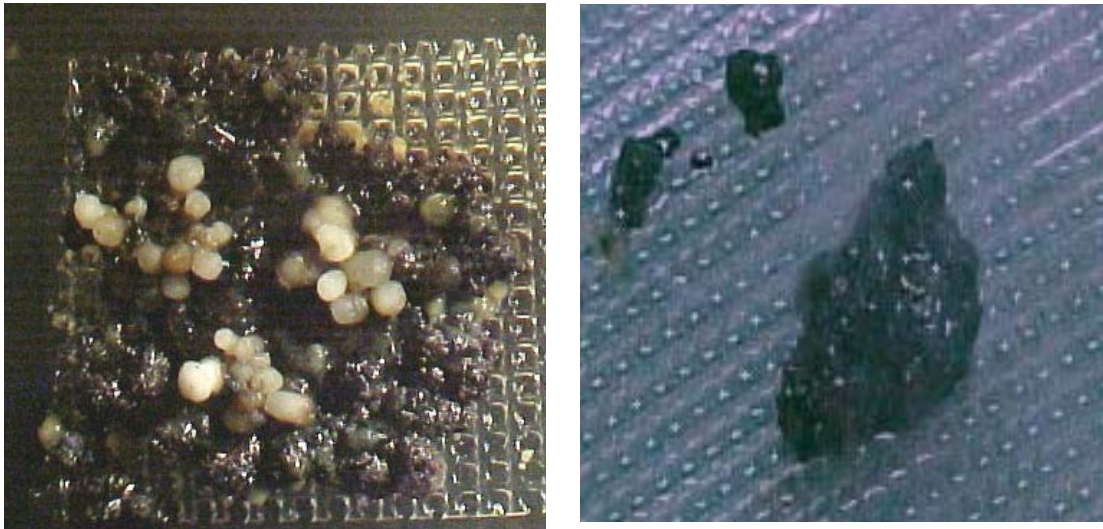


Figura 18. Efecto del herbicida BASTA sobre agregados celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' después de ocho semanas de cultivo para determinar la mínima concentración inhibitoria. Izquierda – 4.0 mg.L⁻¹. Derecha – 6.0 mg.L⁻¹.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los de Busot *et al.* (1999), quienes realizaron un estudio similar para determinar la mínima concentración inhibitoria del herbicida BASTA en agregados celulares del cultivar 'Gran Enano'. Bui (1994) obtuvo resultados similares en suspensiones celulares de *Musa acuminata* spp. *burmannica* tipo Long Tavoy (AA), *banksii* (AA), *malaccensis* (AA) y Matavia cv. Inconnu (ABB). Panis *et al.* (1996) plantearon que en el CATIE, la selección con el BASTA en embriones somáticos y suspensiones celulares embriogénicas, se realiza con una concentración de 5.0 mg.L⁻¹. Mientras que en el CIRAD, la selección de suspensiones celulares embriogénicas transformadas con el plásmido pAHC25, se hizo con una concentración de 12.0 mg.L⁻¹ durante ocho semanas.

Usatorres *et al.* (2001) y Mukhamedkhanova *et al.* (2001) emplearon una concentración de 3.0 mg.L⁻¹ del herbicida BASTA como agente selectivo en la obtención de plantas transgénicas de boniato (*Ipomoea batatas*) y trigo (*Triticum aestivum* L.) respectivamente.



Se determinó como la mínima concentración inhibitoria del herbicida 'BASTA' como agente selectivo en agregados celulares, 6.0 mg.L⁻¹.

Basado en los resultados obtenidos en este trabajo, se propone un esquema para la transformación genética con una pistola de genes de baja presión y con el gas argón, con el empleo de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB) (Figura 19).

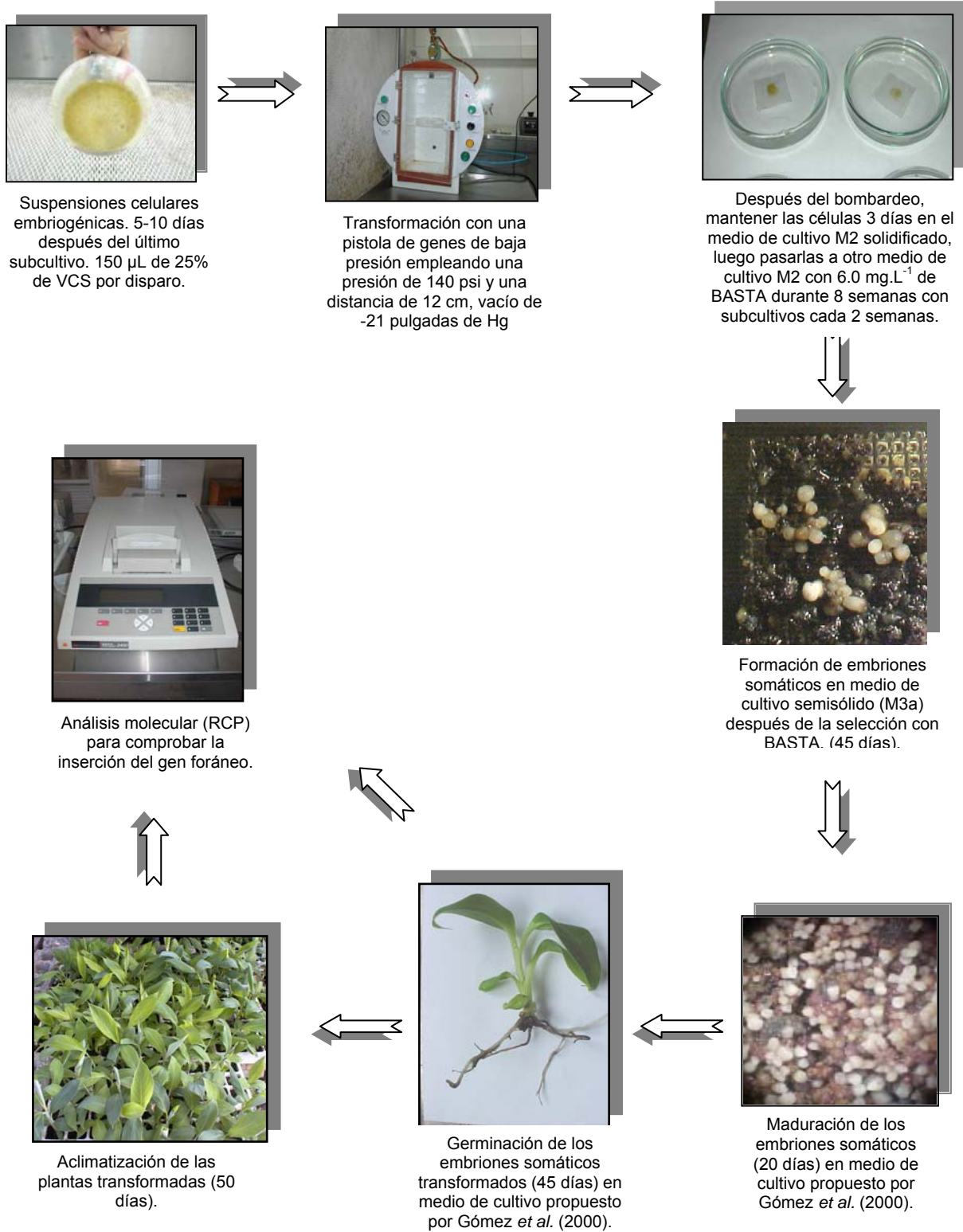


Figura 19. Esquema de la transformación genética vía biobalística mediante el uso de suspensiones celulares del cultivar híbrido de plátano ‘FHIA-21’ (*Musa sp.* AAAB).



5. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los objetivos trazados para la realización de este trabajo y luego de su ejecución y obtención de los resultados discutidos anteriormente, se arriban a las siguientes conclusiones:

1. Se alcanzó el mayor porcentaje (6.52%) de callos con estructuras embriogénicas, formados de las flores masculinas inmaduras, al cultivar los fascículos nodales del 5 al 9 en el medio de cultivo con 4.0 mg.L^{-1} de 2,4-D.
2. Fue posible establecer suspensiones celulares embriogénicas a partir de embriones somáticos formados de los callos, y estas fueron mantenidas con una concentración de 3.0 mg.L^{-1} de 2,4-D en el medio de cultivo. Los subcultivos de estas suspensiones celulares embriogénicas se realizaron cada 12 días y la capacidad de diferenciación de las mismas se mantuvo hasta los 14 meses después de haber sido establecidas.
3. El mayor número (799.5 ± 3.8) de embriones somáticos se formó en el medio de cultivo propuesto por Bieberach (1995) (M3a) y con una densidad celular de 20%, sin embargo, los mayores porcentajes de germinación (81.5 y 82.5%) se alcanzaron con embriones somáticos formados a una densidad de 15%, después de su permanencia de 20 y 30 días respectivamente en el medio de cultivo propuesto por Gómez *et al.* (2000).
4. La mayor expresión GUS (73.0 puntos azules) se alcanzó con una presión de 140 psi y una distancia de 12 cm con el empleo de una pistola de genes de baja presión y el argón como el gas propulsor.
5. Los plásmidos pUGCI y pAHC25, conducidos por el promotor poliubiquitina del maíz, produjeron la mayor expresión transitoria (78.16 y 74.16 puntos azules respectivamente) del gen *uidA*, con la aplicación del protocolo de recubrimiento propuesto por Sanford *et al.* (1993).



-
6. Con el empleo de agregados celulares, recolectados a los 5 y a los 10 días después del subcultivo, se lograron las mayores eficiencias de transformación con un solo disparo sobre el blanco biológico.

 7. Se determinó que 6.0 mg.L^{-1} del herbicida BASTA fue la concentración mínima inhibitoria en agregados celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.



6. RECOMENDACIONES.

1. Utilizar el esquema propuesto para la obtención de plantas vía embriogénesis somática en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.
2. Emplear el esquema propuesto para la transformación genética del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' con el uso de construcciones genéticas que contengan genes de interés.
3. Evaluar el comportamiento de plantas procedentes de embriones somáticos en el campo para comprobar su estabilidad genética y compararlas con plantas obtenidas por organogénesis.
4. Continuar los estudios del sistema de selección en plantas, con el herbicida BASTA como agente selectivo.



7. BIBLIOGRAFÍA.

- Agramonte D., Pérez J., Pérez M., Pérez A. 1993. Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCl) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. *Centro Agrícola* 2, 88-89.
- Alizadeh S., Mantell S.H. 1991. Early cellular events during direct somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Solanum aviculare* Forst. *Annals of Botany* 67, 257-263.
- Amarasinghe V., Dhami R., Carlson J.E. 1996. Polyamine biosynthesis during somatic embryogenesis in interior spruce (*Picea glauca* x *Picea engelmannii* complex). *Plant Cell Reports* 15, 495-499.
- Ammarito P.V. 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: suspensions culture techniques and hormone requirements. *Bio/Technology* 1, 68-73.
- Arencibia A., Vásquez R., Prieto D., Téllez P., Carmona E., Coego A., Hernández L., De la Riva G., Selman-Housein G. 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Mol. Breed.* 3, 247-255.
- Armeleo D., Ye G., Johnston S., Klein T., Shark K., Sanford J. 1990. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* 17, 97-103.
- Arntzen C.J. 1993. Biotechnology and bananas. In: *Banana and Plantain Breeding: Priorities and Strategies*. La Lima, Honduras, 2-3 May, 1994. INIBAP, Montpellier, France. Pp. 46-48.
- Baker C.M., Durham R.E., Burns J.A., Parrott W.A., Wetzstein H.Y. 1995. High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed. *Plant Cell Reports* 15, 38-42.
- Barceló J.C., Nicolás G.R., Sabater B.G., Sánchez R.T. 1995. *Fisiología vegetal*. Ediciones Pirámide, S.A. Madrid. Pp. 354-374.
- Barranco L.A. 2000. Desarrollo de la embriogénesis somática en medios líquidos (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano'). Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 30-47.



-
- Barranco L.A. 2001. Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. FHIA-18) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis para aspirar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara. Pp 97.
- Beachy R.N., Loesch-Fries S., Tumer N.E. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infections. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28, 451-474.
- Becker D., Dugdale B., Prasad S., Hafner G., Beetham P., Rodoni B., Carrin I., Smith M., Harding R., Dale J. 1997. The transformation of banana with potential virus resistance genes. International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. Brisbane, Australia 126.
- Becker D., Dugdale B., Smith M., Harding R., Dale J. 2000. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. 'Grand Nain' via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 19, 229-234.
- Bermúdez I. 2000. Selección de somaclones mejorados en el híbrido de plátano FHIA-21 (AAAB) con el uso combinado de la mutagénesis *in vitro* y el cultivo de tejidos. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 34-52.
- Bhaskaran S., Smith R.H. 1992. Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. *Plant Cell Reports* 12, 22-25.
- Bieberach C. 1995. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* spp. Tesis para optar al grado de *Magíster Scientiae*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p. 86.
- Birch R.G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 297-326.
- Brasileiro A.C.M., Aragão F.J.L. 2001. Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. *Journal of Plant Biotechnology*. Vol. 3. (3). 113-121.
- Brown D.C.W., Finstad K.I., Watson E.M. 1995. Somatic embryogenesis in Herbaceous Dicots. En: Thorpe T.A. (Ed) *In vitro* embryogenesis in plant. London: Kluwer Academic Publishers pp. 345-415.



- Bui T.V. 1994. Utilisation de systemes cellulaires en vue de l'introgession de genes d'interet agronomique pour l'amelioration des bananiers. These présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences. Universite de Paris XI, Orsay, France. Pp. 271.
- Busot G., Gómez R.K., Reyes M., de la Riva G., Más L., Vásquez R. 1999. Expresión del gen *uidA* en suspensiones celulares de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) empleando *Agrobacterium tumefaciens*. Libro de reportes cortos. 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Junio 16-19.
- Cabrera M. 2001. Embriogénesis somática en *Musa* (AAB) cv. Navolean empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 29-45.
- Cabrera-Ponce J., Vegas-García A., Herrera-Estrella L. 1995. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 15, 1-7.
- Cao J., Wang Y.C., Klein T.M., Sanford J.C., Wu R. 1990. Transformation of rice and maize using biolistic process. *Plant Gene Transfer* pp 21-33.
- Caplan A., Berger P.H., Naderi M. 1998. Phenotypic variation between transgenic plants: What is making gene expression unpredictable? In: Jain *et al.* (Eds.) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers. Pp. 539-562.
- Carrasco J.F. 1999. Plantas transgénicas. *Biología Vegetal*. Butlletí Centre d'Estudis de la Natura del Barcelonés Nord., IV (3).
- Charest P.J., Caléro N., Lachance D., Datla D.S.S., Duchêsne L.C., Tsang E.W.T. 1993. Microprojectiles-DNA delivery in conifer species, factors affecting assessment of transient gene expression using the β -glucuronidase reporter gene. *Plant Cell Reports* 12, 189-193.
- Chen J., Boylard M., Saxena R., Sticklen M. 1992. Production of insect resistant potato by genetic transformation with an d-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*, var. *Kurstaki*. *Plant Sci.* 81, 83-91.
- Choudhary M.L., Chin C.K. 1995. Somatic embryogenesis in cell suspension culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Growth Regulation* 16, 1-4.



- Christensen A.H., Sharrock R.A., Quail P.H. 1992. Maize polyubiquitin genes – structures, thermal perturbation of expression and transcript slicing, and promoter activity following transfer to protoplast by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18, 675-689.
- Christou P. 1995. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. *Euphytica* 85, 13-27.
- CINVESTAV. 2000. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.
- Côte F., Domergue R., Monmarson S., Schwendiman J., Teisson C., Escalant J. V. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. 'Grand Naine'. *Physiologia Plantarum* 97, 285-290.
- Côte F., Folliot M., Domergue R., Dubois C. 2000. Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grand Naine). *Euphytica* 112, 245-251.
- Daniels D. 1999. Micropropagación del clon de plátano híbrido FHIA-21 (AAAB) y sus somaclones. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. p. 64.
- De la Riva G., González-Cabrera J., Vásquez-Padrón R., Ayra-Prado C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1: <http://ejb.ucv.cl/content/vol1/issue3/full/1/index.html>
- De Vries S.C., Booij H., Meyerink P., Huisman G., Wilde H.D., Thomas T.L., Van Kammen A. 1988. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell suspension cultures. *Planta* 176, 196-204.
- Del Sol L. 1995. Embriogénesis somática en plátanos y bananos (*Musa* spp.) partiendo de flores masculinas inmaduras. Tesis para aspirar al grado científico de *Magíster Scientiae* en Biotecnología Vegetal. IBP. Santa Clara p. 62.
- Dennis J., Trigiano N., Conger V. 1993. Liquid suspension culture production of Orchard grass somatic embryos and their potential for the breeding of improved varieties. En: Redenbaugh K. (Ed) *Synseeds applications of synthetic seeds to crop improvement*, pp. 351-365. Calgene Inc. Daris, California.



- Dhed'a D. 1992. Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et regeneration en plantules par embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.), Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 171.
- Dhed'a D., Dumortier F., Panis B., Vuylsteke D., De Langhe E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* sp. ABB group). *Fruits* 46, 125-135.
- Dudits D., Györgyey J., Bögre L., Bako L. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. En: Thorpe T.A. (Ed) *In vitro* embryogenesis in plants. London: Kluwer Academic Publishers pp. 267-308.
- Ellis D., McCabe D., McInnes S., Ramachandrin R., Russell D., Wallace K., Martinell B., Roberts D., Raffa K., McCown B. 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Biotechnology* 11, 84-89.
- Enríquez G. 2002. Evaluation of *bar* as a selectable marker and production of herbicide resistant plants. En: Resúmenes. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Villa Clara, Cuba. Pp. 19-20.
- Escalant J.V. 2002. Comunicación personal. INIBAP. Francia.
- Escalant J.V., Teisson C., Cote F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro* Plant Cell. and Dev Biol. 30, 181-186.
- Evans D.A., Sharp W.R., Flick C.E. 1981. Growth and behavior of cell cultures. Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe T.A. (ed). *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Proceedings of UNESCO Symposium. Sao Paulo, Brazil, 1978. New York: Academic Press pp. 45-113.
- FAO 2002. <http://www.fao.org>
- Feirer R.P., Simon P.W. 1991. Biochemical differences between carrot inbreds differing in plant regeneration potential. *Plant Cell Reports* 10, 152-155.
- FHIA 2002. <http://www.fhia.hn>



-
- Finer J., Vain P., Jones M., McMullen M. 1992. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* 11, 323-328.
- Fischhoff D., Bowdish K., Perlak F., Marrone P., McCormic S., Niedermeyer J., Dean D., Kusano-Kretzmer K., Mayer E., Rochester D., Rogers S., Fraley R. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technol.* 5, 807-813.
- Fitch M., Manshardt R.M., Gonsalves D., Slighton J., Sanford J. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Biotechnol.* 10, 1466-1472.
- Franche C., Bogusz D., Schöpke C., Fauquet C., Beachy R. 1991. Transient gene expression in cassava using high-velocity microprojectiles. *Plant Mol. Biol.* 17, 493-498.
- Fuji J., Slade D., Olsen R., Ruzin S., Redenbaugh K. 1990. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci.* 72, 93-97.
- Ganapathi T.R., Higgs N.S., Balint-Kurti P.J., Arntzen C.J., May G.D., Van Eck J.M. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Reports* 20, 157-162.
- Georget F., Côte F.X., Domergue R., Ferrière N. 2000. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv 'Grande Naine') embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports* 19, 748-754.
- Gil V., Martínez S., Más L. 1998. Transformación Genética. En: Pérez Ponce J. (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, pp. 369-390.
- Gómez R.K. 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez J.N. (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, pp. 57-79.
- Gómez R.K., De Fera M., Posada L.P., Gilliard T., Bernal F.M., Reyes M.V., Chávez M.M., Quiala E.M. 2002. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, 21-26.



- Gómez R.K., Escalant J., Reyes M., Posada L., Freire M. 1999. Embriogénesis somática en medio líquido en el cv. 'Gran Enano' (*Musa AAA*). CORBANA 25(52), 143-154.
- Gómez R.K., Gilliard T., Barranco L.A., Reyes M. 2000. Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB). INFOMUSA 9(1), 12-16.
- Grapin A. 1995. Regeneration par embryogenese somatique en milieu liquide et transformation genetique par biolistique de bananiers de et triploides. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agronómicas. Escuela Nacional Agronómica, Francia.
- Grapin A., Frigout O., Monmarson S., Legavre T., Côte F. 1996b. Gus reporter gene expression in transformed embryogenic cell suspensions of banana (*Musa sp.*) In: Meeting on tropical plants. Communications and posters, Montpellier, France, p. 294.
- Grapin A., Ortiz J.L., Domergue R., Babeau J., Monmarson S., Escalant J.V., Teisson C., Cote F. 1998. Obtención de callos embriogénicos, iniciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas a partir de flores inmaduras masculinas y femeninas de *Musa*. INFOMUSA 7(1), 13-15.
- Grapin A., Schwendiman J., Teisson C. 1996a. Somatic embryogenesis in plantain banana. *In vitro Plant Cell. and Dev. Biol.* 32, 66-71.
- Hain R., Biessler B., Kindl H., Schröder G., Stöcker R. 1990. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol. Biol.* 15, 325-335.
- Halperin W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *American Journal of Botany* 53, 443-453.
- Hamilton A., Lycett G., Gierson D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346, 284-287.
- Hayakawa T., Zhu Y., Hoh K., Kimura Y., Izagua T., Shimamoto K., Toriyama S. 1992. Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9865-9869.



-
- Hébert D., Kikkert J.R., Smith F.D., Reisch B.I. 1993. Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspension. *Plant Cell Reports* 12, 585-589.
- Hepher A., Boulter M.E., Harris N., Nelson R.S. 1988. Development of a Superficial Meristem During Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean (*Glycine max* L.). *Annals of Botany* 62, 513-519.
- Herrera-Estrella L. 1983. Transfer and expression of foreign genes in plants. PhD thesis. Laboratory of Genetics, Gent University, Belgium.
- Hill M., Launis K., Bowman C., McPherson K., Dawson J., Watkins J., Koziel M., Wright M. 1995. Biolistic introduction of a synthetic *Bt* gene into elite maize. *Euphytica* 85, 119-123.
- Ho W.J., Vasil I.K. 1983. Somatic embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension Cultures. *Annals of Botany* 51, 719-726.
- INIBAP 1998. Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 1997. International network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France.
- Ivanova A., Velcheva M., Denchev P., Atanassov A., Van Onckelen H.A. 1994. Endogenous hormone levels during direct embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiologia Plantarum* 92, 85-89.
- Jach G., Görnhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J., Maas C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-100.
- Jansen M.A.K., Booij H., Schel J.H.N., De Vries S.C. 1990. Calcium increase the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 9, 221-223.
- Jeannin G., Bronner R., Hahne G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar, *Plant Cell Reports* 15, 200-204.
- Jefferson R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5, 387-405.



- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M. 1987. Gus fusion: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene-fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6, 3901-3907.
- Jiménez E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez J.N. (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 13-24. IBP, Santa Clara.
- Kartha K.K., Chibbar R.N., Georges F., Leung N., Caswell K., Kendall E., Qureshi J. 1989. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 8, 429-432.
- Kaush A., Adams T., Mangano M., Zachwieja S., Gordon W., Daines R., Willets N., Chambers S., Adams W., Anderson J., Williams G., Haines G. 1995. Effects of microprojectile bombardment on embryogenic suspension cell cultures of maize (*Zea mays* L.) used for genetic transformation. *Planta* 196, 501-509.
- Kim J.K., Xu D., Duan X., Hwang Y.S., Wu R. 2001. Expression of a maize ribosome-inactivating protein gene in transgenic rice. *Transgenic Res.* Vol. 11, No. 8, 289-296.
- Kiyosue T., Satoh S., Kamada H., Harada H. 1991. Purification and Immunohisto-chemical Detection of an Embryogenic Cell Protein in Carrot. *Plant Physiology* 95, 1077-1083.
- Klein T., Fromm M., Gradziel T., Sanford J. 1988a. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technol.* 6, 559-563.
- Klein T., Fromm M., Weissinger A., Tomes D., Schaaf S., Sleeten M., Sanford J. 1988b. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high velocity microprojectiles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 4305-4309.
- Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D., Christou P. 1998. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7203-7208.
- Krishnaraj S., Vasil I.K. 1995. Somatic embryogenesis in Herbaceous Monocots En: Thorpe T.A. (ed). *In vitro* embryogenesis in plant. London: Kluwer Academic Publishers pp. 417-470.



- Lazzeri P.A., Hildebrand D.F., Collins G.B. 1987. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Molecular Biology Reporter* 10, 209-215.
- Legavre T. 1995. Protocolo de preparación y recubrimiento de los microproyectiles. CIRAD, Montpellier, France.
- Levine M. 1950. The growth of normal plant tissues *in vitro* as affected by chemical carcinogens and plant growth substances. The culture of the carrot tap root meristem. *American Journal of Botany* 37, 445-458.
- Iida A., Yamashida T., Yamada Y., Morikawa H. 1991. Efficiency of particle bombardment-mediated transformation is influenced by cell cycle stage in synchronized cultured cells of tobacco. *Plant Physiol.* 97, 1585-1587.
- Liu C.M., Xu Z.H., Chua N.H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5, 621-630.
- Lonsdale D., Onde S., Cumming A. 1990. Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 41, 1161-1165.
- López Z.M. 1989. El plátano. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.
- Ma S.S. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops. Taipei, Taiwan. National Taiwan University, June pp. 181-188.
- Mahon R., Bateson M., Chamberlain D., Higgins C., Drew R., Dale J. 1996. Transformation of an Australian variety of *Carica papaya* using microprojectile bombardment. *Aust. J. Plant Physiol.* 23, 679-685.
- Marroquín C.G., Paduscheck C., Escalant J.V., Teisson C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro Plant Cell. and Dev Biol.* 29, 43-46.
- Martini N., Egen M., Rüntz I., Strittmatter G. 1993. Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Mol. Genet.* 236, 179-186.



- Más L. 2002. Expresión transitoria de la β -glucuronidasa en papaya (*Carica papaya* L.) empleando una pistola de genes de baja presión. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 33-50.
- Más L., Agüero G., Gil V., Reyes M., Gómez R., Ocaña B., Martínez S. 2000. Optimización de parámetros en la transformación de embriones somáticos de banano utilizando pistola de genes. *Biotecnología Vegetal* 1, 51-54.
- May G., Afza R., Mason H., Wiecko A., Novak F., Arntzen C. 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio Technol.* 13, 486-490.
- McCain J.W., Kamo K.K., Hodges T.K. 1988. Characterization of somatic embryo development and plant regeneration from friable maize callus cultures. *The Botanical Gazette* 149, 16-20.
- McCown B.H., McCabe D.E., Russell D.R., Robinson D.J., Barton K.A., Raffa K.F. 1991. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports* 9, 590-594.
- Merkle S.A., Parrott W.A., Flinn B.S. 1995. Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe T.A. (ed). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. London pp. 155-203.
- Molina P., Goyenechea B., Morán R., Abad A., Romero L., De La Riva G., Pérez S. 1991. Actividad larvicida en plantas transgénicas de tabaco. *Biotecnología Aplicada* 8, 191.
- Moy Y., Hanson B., Gutterson N., Engler D. 1998. Development of an efficient banana transformation method and analysis of the expression of some constitutive promoters in young transgenic plants. In: *Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century: abstracts*. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Israel, p. 140.
- Mukhamedkhanova F.S., Belogradova K.A., Djataev S.A., Abdoukarimov AA. 2001. The particle bombardment as the method for obtaining of the transgenic herbicide-resistant plants of wheat (*Triticum aestivum* L.) En: Libro de reportes cortos. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. Bioveg 2001. pp. 30.



-
- Murashige T., Skoog T. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.
- Navarro C., Escobedo R., Mayo A. 1997. *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51, 17-25.
- Nayak P., Sen S.K. 1989. Plant Regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of a minor millet, *Paspalum scrobiculatum*. *Plant Cell Reports* 8, 296-299.
- 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 desert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.) *BioTechnol.* 7, 147-158.
- Orellana P. 1994. Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis para aspirar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara. Pp 120.
- Panis B. 1995. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germoplasm. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 201.
- Panis B., Côte F., Escalant J.V., Sági L. 1996. Aspects of genetic engineering in banana. In: Frison E., Horry J.P., De Waele D. (eds). *New frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium and Sigatoka*. INIBAP, Montpellier, France pp. 182-198.
- Parrott W.A. 1993. Cell-Culture techniques. In: INIBAP (ed). *Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement*. Proceedings of the workshop held in San José, Costa Rica. 27-31 January, 1992. pp. 183-191.
- Parrott W.A., Merkle S.A., Williams E.G. 1991. Somatic embryogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer systems. En: Murray D.R. (Ed) *Advanced methods in plant breeding and Biotechnology*. CAB International, Oxford, pp. 158-200.
- Pérez J.B. 2000. Development and Application of *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation to Increase Fungus-Resistance in Banana (*Musa* spp.). Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 186.



-
- Pérez J.N. 1998. Variación Somaclonal. En: Pérez J.N. (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 105-121. IBP, Santa Clara.
- Pérez J.N., Jiménez E., Gómez R. 1998. Field performance of selected sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids) mutants. En: Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. (Eds). Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. Pp. 449-464.
- Pérez J.N., Orellana P. 1994. *Musa* improvement in Cuba. En: Jones D.R. (Ed) The Improvement and testing of *Musa*: A Global Partnership. Honduras. pp. 203-206.
- Perl A., Kless H., Blumenthal A., Galili G., Galun E. 1992. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimisation of culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures. *Mol. Gen. Genet.* 235, 279-284.
- Raemaekers T., Maes K., Remy S., Cammue B.P.A., Swennen R., Sagi L. 1996. Banana and plantain improvement through genetic manipulation. In: Meeting on tropical plants. Communications and posters, Montpellier, France, p. 211.
- Ratnayaka I., Oard J. 1995. A rapid method to monitor DNA precipitation onto microcarriers before particle bombardment. *Plant Cell Reports* 14, 794-798.
- Reggiardo M.I., Arana J.L., Orsaria L.M., Permingeat H.R., Spitteler A., Vallejos R.H. 1991. Transient transformation of maize tissues by microprojectile bombardment. *Plant Sci.* 75, 237-243.
- Remy S., Buyens A., Cammue B.P.A., Swennen R., Sagi L. 1998. Production of transgenic banana plants expressing antifungal proteins. In: Proceedings of the first international symposium on banana in the subtropics. Puerto de la Cruz, Tenerife, España, pp. 433-436.
- Remy S., Coemans B., Buysse S., Moller-Nielsen N., Santos E., De Weerd G., Swennen R., Sági L. 2002. Promoter tagging in banana. Third International Symposium on Molecular and Cellular Biology of Bananas. Leuven, Belgium. 9-11 September.
- Rey M., Humara J., López M., González M., Rodríguez R., Tavazza R., Ancora G., Ordas R. 1996. Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of trees. Kluwer Acad. Publisher.



- Ritala A., Mannonen L., Aspegren K., Salmenkallio M., Kurten U., Hannus R., Méndez J., Teeri T., Kaupinnen V. 1993. Stable transformation in barley tissue by particle bombardment. *Plant Cell Reports* 12, 435-440.
- Rodríguez J.L., Rodríguez A. 2001. Aspectos socioeconómicos del cultivo del plátano en Colombia. *INFOMUSA* 10(1), 4-9.
- Rodríguez S. 2000. Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca, plátanos y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos de la producción (FAP) y su manejo integrado. Informe final, Programa Nacional Científico.
- Rowe P.R. 1998. Programa de banano y plátano. Informe técnico. Honduras. Pp. 1-18.
- Rowe P.R., Rosales F. 1993. Diploid breeding at FHIA and the development of 'Goldfinger' (FHIA-01). *INFOMUSA* 2, 9-11.
- Russell J., Roy M., Sanford J. 1992. Major improvements in biolistic transformation of suspension cultured tobacco cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28, 97-105.
- Sági L. 2000. Genetic Engineering of Banana for Disease Resistance-Future Possibilities. In: Jones D.R. (ed). *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. CABI International Publishing pp. 465-495.
- Sági L., Panis B., Remy S., Schoofs H., De Smet K., Swennen R., Cammue B.P.A. 1995b. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Bio/Technology* 13, 481-485.
- Sági L., Remy S., Swennen R. 1998. Genetic transformation for the improvement of bananas – a critical assessment. *INIBAP Annual Report 1997*. pp. 33-36.
- Sági L., Remy S., Verelst B., Panis B., Cammue B., Volckaert G., Swennen R. 1995a. Transient gene expression in transformed banana (*Musa* cv. Bluggoe) protoplasts and embryogenic cell suspensions. *Euphytica* 85, 89-95.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.



- Sandoval J., Pérez L., Côte F. 1997. Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano'). Etapas de cultivo *in vitro*, aclimatización y campo. CORBANA 22(48), 41-60.
- Sanford J., Klein T., Wolf E., Allen N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Part. Sci. and Technol. 5, 27-37.
- Sanford J., Smith F., Russell J. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. Meth. In Enzymol 217, 483-509.
- Santana N. 1982. Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) *in vitro*. Cultivos Tropicales Vol. 4. No. 3.
- Sasson A. 2001. Cultivos transgénicos: hechos y desafíos. Editorial Scientiae, La Habana, Cuba. Pp. 373.
- Sato S., Kamada H., Harada H., Fuji T. 1986. Auxin-controlled Glycoprotein Release into the Medium of Embryogenic Carrot Cells. Plant Physiology 81, 931-933.
- Sautter C., Waldner H., Neuhaus-Url G., Galli A., Niehaus G., Potrykus I. 1991. Micro-targeting: High efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. BioTechnol. 9, 1080-1085.
- Schenk P., Sagi L., Remans T., Dietzgen R., Bernard M., Graham M., Manners J. 1999. A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. Plant Molecular biology 39, 1221-1230
- Schenk R. U., Hildebrandt A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. Can. J. Bot. 50, 199-204.
- Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 257.
- Schoofs H., Panis B., Strosse H., Mayo A., López J., Roux N., Dolezel J., Swennen R. 1999. Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares



- morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *INFOMUSA* 8(2), 3-7.
- Seki M., Komeda Y., Iida A., Yamada Y., Morikawa H. 1991. Transient expression of β -glucuronidase in *Arabidopsis thaliana* leaves and roots and *Brassica napus* stems using a pneumatic particle gun. *Plant Mol. Biol.* 17, 259-263.
- Shark K., Smith F., Harpending P., Rasmussen J., Sanford J. 1991. Biolistic transformation of a prokaryote *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 480-485.
- Sharp W.R., Evans D.A., Sondahl M.R. 1982. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. En: Fujiwara A. (ed). *Plant Tissue Culture 1982. Proceedings 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Japan.* Japanese Association for Plant Tissue Culture pp. 759-762.
- SIGMA. 1991. Catalogue Sigma Chemical Company. USA.
- Simmonds N.W. 1962. *The evolution of the Bananas.* London, UK: Longman p. 163.
- Simmonds N.W. 1966. *Bananas.* London, UK: Longman.
- Smith C., Watson C., Morris P., Bird C., Seymour G., Gay J., Arnold C., Tucker G., Schuch W., Gierson D. 1990. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.* 14, 369-379.
- Smith C., Watson C., Ray J., Bird C., Morris P., Schuch W., Gierson D. 1988. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase genes expression in tomatoes. *Nature* 334, 724-726.
- Southgate E.M., Davey M.R., Power J.B., Marchant R. 1995. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnology Advances.* 13, 631-651.
- Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., van Kammen A., De Vries S.C. 1991. Cell-specific Expression of the Carrot EP2 Lipid Transfer Protein Gene. *The Plant Cell* 3, 907-921.
- Steward F.C., Mapes M.O., Smith J. 1958. Growth and organized development of cultured cells. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45, 693-704.



-
- Strittmatter G., Janssens J., Opsomer C., Botterman J. 1995. Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Biotechnol.* 13, 1085-1091.
- Stuart D.A., Strickland S.G. 1984. Embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa*. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Sci. Lett* 34, 74-81
- Sung Z.R., Okimoto R. 1981. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 6, 3683-3687.
- Takeuchi Y., Dotson M., Keen N. 1992. Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Mol. Biol.* 18, 835-839.
- Taylor M.G., Vasil I.K. 1991. Histology of, and physical factors affecting transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) embryos following microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 10, 120-125.
- Taylor M.G., Vasil V., Vasil I.K. 1993. Enhanced GUS expression in cereal/grass cell suspensions and immature embryos using the maize ubiquitin-based plasmid pAHC25. *Plant Cell Reports* 12, 491-495.
- Thompson A.K. 1995. Banana Processing. En: Gowen S. (ed). *Bananas and Plantains*. Chapman and Hall, UK pp. 481-492.
- Toonen M.A.J., Hendriks T., Schmidt E.D.L., Verhoeven H.A., Van Kammen A., De Vries S.C. 1994. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194, 565-572.
- Torres S.G. 2002. Comunicación personal. Facultad de Ciencias Agropecuaria. UCLV, Cuba.
- Usatorres B., Somontes D., Casas S. 2001. Obtención de brotes transformados de boniato, resistente al herbicida BASTA. En: Libro de reportes cortos. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. Bioveg 2001. pp. 28.
- Vain V., McMullen M.D., Finer J.J. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12, 84-88.



- Van Boxtel J., Berthouly M., Carrasco C., Dufour M., Eskes A. 1995. Transient expression of β -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. *Plant Cell Reports* 14, 748-752.
- Van der Wilk F., Willink D., Hulsman M., Huttinga H., Goldbash R. 1991. Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. *Plant Mol. Biol.* 17, 431-439.
- Vasil K. 1985. Somatic embryogenesis and its consequences in the *Gramineae*. En: Henke R.R., Hughes K.W. and Constantin M.J. (eds). *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. New York, Plenum Press. p. 31.
- Vasil K. 1987. Developing Cell and Tissue Culture Systems for the Improvement of Cereal and Grass Crops. *Journal of Plant Physiology* 128, 193-218.
- Vasil K. 1994. Automation in plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39(2): 105-108.
- Vasil V., Brown S., Re D., Fromm M., Vasil K. 1991. Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology* 9, 743-747.
- Vasil V., Vasil K. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet, *Gramineae*). *American Journal of Botany* 69, 1441-1449.
- Vásquez E.B., Torres S.G. 1995. *Fisiología Vegetal*. Editorial Pueblo y Educación. Pp. 315-375.
- Villalobos V., Thorpe T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W.M., Mroginski L.A. (Eds) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, pp. 127-141. CIAT, Colombia.
- Vuyksteke D. 2001. Strategies for utilization of genetic variation in plantain improvement. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium. 213 p.
- Widholm J. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of culture plant cells. *Stain Technology* 47, 189-194.



-
- Wiggans S.C. 1954. Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany* 41, 321-326.
- Williams E.G., Maheswaran G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57, 443-462.
- Willmitzer L. 1993. Transgenic plant. In: Rehm H. y Reed G. (eds.) *Biotechnology*. Verlag Chemie, Weinheim, pp 627-659.
- Yibrah H., Manders G., Clapham D. Von Arnold S. 1994. Biological factors affecting transient transformation in embryogenic suspension cultures of *Picea abies*. *Journal of Plant Physiol.* 144, 472-478.