

1 **Establecimiento de Suspensiones Celulares Embriónicas y Neoformación en Plantas de**
2 **Variedad Diploide Calcutta-4 (AA) Resistente a Sigatoka Negra**

3 Korneva de Maribona S. y J. Mendoza

4 Escuela Superior Politecnica de Litoral(ESPOL)

5 Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador

6 Campus Gustavo Galindo, Prosperina Km.30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador

7 skorneva@espol.edu.ec ; cibe@espol.edu.ec

8 **Abstract.**For the generation of banana embryogenic cell suspensions, *in vitro* plants obtained from the
9 Internacional Transit Centre of the INIBAP were used as explant. *In vitro* plants were maintained and
10 propagated at the Tissue Culture laboratory of CIBE. Calli from ‘Calcutta 4’, with different consistency and
11 colour, were obtained through culture of the apical micromeristems from *in vitro* plants in MS liquid medium
12 supplemented with 2,4D (1mg/l) and used for the development of primary cell suspensions.The few
13 embryogenic cells detected two months after initiation from calli were captured through the subculture of the
14 suspensions in solid ZZ medium with higher auxins concentration. Therefore, multiplication of embryogenic
15 cells and several microcalli were obtained, which were used for the development of embryogenic cell
16 suspensions of Calcutta -4. For the formation of embryos, the cell suspensions were subcultured on ZZ
17 medium without hormones. After three months, more than 60% of the embryos were germinated and capable
18 of regenerate in plants on MPK medium. **Keywords:** *banana, embryogenic cell suspensions, embryos, plant*
19 *regeneration.*

20 **Resumen**

21 Como material biológico de partida se emplearon vitroplantas recibidas de la Colección
22 Mundial de Musa (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) y
23 propagadas posteriormente en laboratorio de Cultivo de Tejidos del CIBE. Los callos de
24 Calcutta-4, de diferente consistencia y color, fueron logrados mediante siembra del micro

25 meristemo apical de vitroplántas en medio líquido MS modificado (1mg/l 2,4D) y
26 utilizados para obtención de las suspensiones celulares primarias. Las pocas células
27 embriogénicas detectadas dos meses después del inicio de la desagregación de los callos,
28 fueron capturadas mediante la siembra de las suspensiones en medio sólido ZZ con mayor
29 concentración de auxinas, lo que provocó la multiplicación de células embriogénicas y la
30 obtención de varios microcallos, los cuales fueron utilizados para la obtención de las
31 suspensiones celulares embriogénicas de la variedad mencionada. Para la formación de los
32 embrioides, las suspensiones celulares fueron sembradas en el medio de cultivo
33 mencionado en ausencia de las fitohormonas. Pasados tres meses más de 60% de los
34 embrioides obtenidos fueron capaces de germinar y posteriormente neoformar plantas en el
35 medio MPK. **Palabras claves:** *banano, suspensiones celulares embriogénicas, embrioides,*
36 *neoformación de plantas.*

37 **Introducción**

38 Los cambios climáticos experimentados en las últimas décadas y el ataque de numerosas
39 plagas y enfermedades, incluyendo la Sigatoka Negra, ha afectado la producción y los
40 rendimientos del banano en el Ecuador, uno de los principales renglones de la economía
41 ecuatoriana y de otros países del mundo, provocando la disminución de alimentos para la
42 población, menor entrada de recursos al país y aumento de la pobreza.

43 La obtención de nuevas variedades de banano con tolerancia a la enfermedad mencionada
44 constituye la mejor solución al problema, sin embargo, por vía convencional este proceso
45 es muy lento y difícil, debido al elevado nivel de esterilidad, la necesidad de realizar cruces
46 entre individuos de diferente ploidía, la baja proporción de germinación de las semillas y el

47 largo ciclo de vida de las plantas. La transformación de suspensiones celulares
48 embriogénicas mediante ingeniería genética constituye una alternativa viable y
49 prometedora (Sweenen, *et al.*, 2003). La variedad Calcutta-4 es una variedad silvestre,
50 resistente a la Sigatoka Negra y por tal razón, la obtención de las suspensiones celulares
51 embriogénicas de ésta tiene gran interés e importancia para el estudio de la interacción
52 planta – patógeno a nivel tisular y molecular y el mejoramiento genético. Sin embargo, no
53 existen referencias acerca de la obtención de suspensiones celulares de esta variedad,
54 capaces de neoforar plantas (Strosse, *et al.*, 2004).

55 El objetivo de este trabajo ha sido obtener los callos embriogénicos y establecer las
56 suspensiones celulares de la variedad Calcutta-4 capaces neoforar plantas.

57 **Materiales y Métodos**

58 Como material biológico de partida se emplearon vitroplantas de Calcutta-4 recibidas de
59 Colección Mundial de Musa (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven,
60 Bélgica) y propagadas posteriormente en el laboratorio Cultivo de Tejidos del CIBE
61 siguiendo el protocolo establecido previamente (Korneva y Maribona, 1988).

62 Para obtener los callos embriogénicos de esta variedad, los meristemos apicales de plantas
63 propagadas *in vitro*, fueron sembrados en el medio de cultivo líquido H1 en presencia de 1
64 mg/l de auxina 2,4D (Díaz, *et al.*, 1991) y mantenidos bajo permanente agitación en una
65 zaranda orbital a 90 rpm.

66 Las estructuras obtenidas fueron colocadas en frascos con el medio de cultivo ZZ (Panis, *et*
67 *al.*, 2001) manteniéndose el mismo régimen de agitación mencionado anteriormente. Para
68 aumentar el contenido de células embriogénicas en la desagregación, estas fueron
69 resembradas en un medio de cultivo líquido ZZ-3 con 3mg/l de 2,4D (Korneva,et

70 al.,2007).Posteriormente, para la obtención de callos de calidad necesaria, las suspensiones
71 celulares enriquecidas en células embriónicas fueron resembradas sobre la superficie del
72 medio sólido ZZ. Los microcallos obtenidos, de consistencia friable, fueron colocados
73 después en el medio líquido anteriormente mencionado manteniendo la agitación. El medio
74 de cultivo fue renovado cada 14-21 días, sustituyendo 1/3 del volumen por uno recién
75 preparado. Este procedimiento se realizó hasta el establecimiento de la suspensión celular.
76 Con el objetivo de neoformar los embrioides y confirmar el carácter embriónico de las
77 suspensiones celulares obtenidas de Calcutta-4, 1ml (0.3 VCP)) de las suspensiones fueron
78 sembradas en cada placa Petri sobre el medio de cultivo sólido en ausencia de fitohormonas
79 (Panis, *et al.*, 2001). Los embrioides obtenidos fueron resembrados en el medio MPK,
80 modificado MS (Murashige y Skoog, 1962; Korneva y Maribona ,1988) para inducir su
81 germinación y la posterior neoformación en plantas.

82 **Resultados y Discusión**

83 Obtención de callos embriónicos y establecimiento de las suspensiones celulares.

84 Luego de 1-2 meses de la siembra de los micromeristemas apicales de la variedad
85 Calcutta- 4 en el medio líquido H1, se observó la formación alrededor de los meristemas
86 de estructuras globulares y otros tejidos de diferente consistencia y color.

87 Dos meses después de haber colocados estos tejidos en el medio de cultivo líquido ZZ, se
88 obtuvieron suspensiones celulares en las cuales se detectaron muy pocas células
89 embriónicas, pequeñas y redondas, con el citoplasma denso, similares a las descritas
90 previamente (Dhed, *et al*, 1991). La realización de varias resiembras de las suspensiones
91 celulares obtenidas en medio ZZ -3, permitió incrementar la cantidad de células
92 embriónicas luego de 3-4 meses.

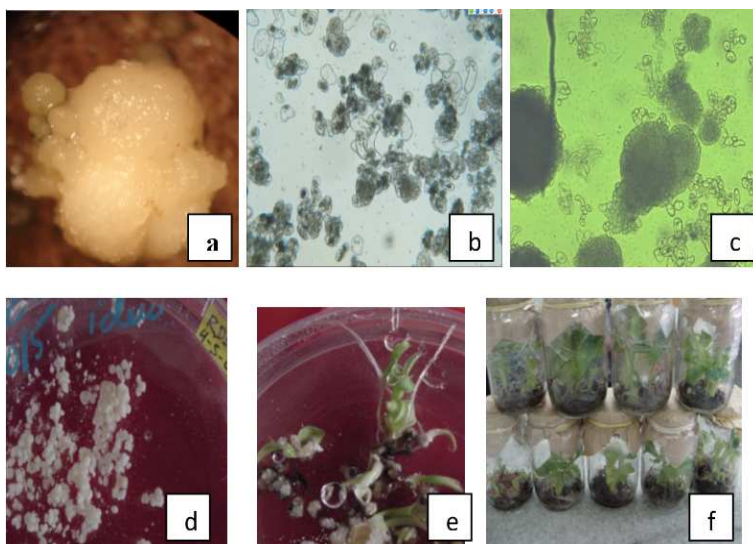
93 Transcurridas 5-6 semanas de la siembra de las suspensiones celulares enriquecidas con
94 células embriogénicas en el medio sólido ZZ (Panis, *et al.*, 2001), fueron observados varios
95 microcallos friables de 2 x 2 x 1mm aproximadamente, los cuales posteriormente dieron
96 inicio a las suspensiones celulares embriogénicas utilizadas para la regeneración de nuevas
97 plantas.

98 Neoformación de plantas a partir de las suspensiones celulares embriogénicas.

99 Luego de sembrar las suspensiones celulares obtenidas sobre la superficie del medio sólido
100 en ausencia de las hormonas (RDI), a los 3 - 4 semanas después, fue posible detectar, bajo
101 observación en el microscopio estereo, presencia de embrioides en distintos estadios de su
102 desarrollo. A los 1- 2 meses después de haber sembrados los embrioides formados en el
103 medio de cultivo MPK ,podría observar en estos el aumento en su volumen, cambio de
104 color de blanco a verdoso y la germinación, reflejada en crecimiento de raíces y parte
105 foliar.Mas de 1300 embrioides de esta variedad fueron obtenidos a partir de 1 ml de
106 suspensión, con más de 60% de germinación y conversión en brotes (Figura.1).

107 Para la obtención de callos embriogénicos de especies del género Musa se ha referido el
108 uso de diferentes explantes y métodos (Cote, *et al.*, 1996; Dhed, *et al.*, 1991; Escalant, *et*
109 *al.*, 1994; Schoofs, *et al.*, 1999; Panis *et a.*, 2001). En las investigaciones anteriores
110 realizadas en el CIBE ,con el objetivo de obtener callos de la variedad Calcutta - 4 se utilizó
111 como material inicial multimeristemas apicales (*scalps*), sin embargo no se logró la
112 obtención del tejido indiferenciado con la consistencia necesaria que permitiera el
113 establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas. La siembra de aproximadamente
114 500 explantes de flores masculinas (*posición de 5 a 15*) de la variedad mencionada en
115 diferentes medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos, tampoco arrojó resultados

116 positivos (Korneva, 2007). Adicionalmente, ese material biológico no se encuentra



117

118 **Figura.1.** Distintas etapas de obtención de plantas de variedad Calcutta-4 a partir de las
 119 suspensiones celulares: a) *callo friable embriogénico*; b) y c) *células meristemáticas,*
 120 *proembrioides y embrioides* ; d) *embrioides obtenidos a los dos meses de haber sembrado*
 121 *la suspensión en el medio sin hormonas*; e) *primer brote neoformado a partir de los*
 122 *embrioides* ; f) *plantas de la var. Calcutta - 4 a los 5-6 meses de haber sembrado los*
 123 *embrioides en el medio de neoformación de plantas MPK.*

124 de manera disponible y abundante. Es por ello que el método utilizado en el presente
 125 trabajo podría considerarse como una solución exitosa y sostenible frente a las dificultades
 126 anteriores, ya que permitió la obtención de las suspensiones celulares deseadas en un
 127 período de 5-6 meses a partir un material inicial (vitroplantas) que puede mantenerse en el
 128 laboratorio permanentemente mediante manipulaciones habituales y sin dependencia del
 129 estado fisiológico de plantas adultas y el periodo estacional (Escalant, et al.,1994).

130

131

132 **Conclusiones**

133 El uso de meristemas apicales de plantas propagadas *in vitro* de la variedad Calcutta-4,
134 unido al empleo de los medios de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de
135 auxina de 2,4D (1-3mg/l), permitió la obtención de callos embriogénicos, luego de cuya
136 desagregación fueron obtenidos las suspensiones celulares capaces de neoforar plantas
137 en una proporción superior al 60% .

138 **Bibliografía**

139 Cote F.X., Domergue, S., Montarson, J., Schwendiman,C., Teisson, C.& Escalant, J-V.
140 (1996). Embriogenic cell suspensions from male flowers of Musa AAA cv. Grand Nain.
141 *Physiologia Plantarum* 97: 285- 290.

142 Dhed, A.D., Dumortier F., Panis B., Vuylsteke, D. & de Langhe, E. (1991). Plant
143 regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. “ Bluggoe” (Musa spp
144 ABB group). *Fruits*: 46 (2): 125-135.

145 Díaz E., Korneva, S., Maribona R.H & Ancheta O. (1991). Morfogénesis de las
146 suspensiones celulares de la caña de azúcar. *Biotecnología Aplicada*,v.8 No, pp59-62
147 CIGB, La Habana, Cuba.

148 Escalant J.V., Teisson C. & Côte F. (1994). Amplified somatic embryogenesis from male
149 flowers of triploid banana and plantain cultivars (Musa spp). *In Vitro Cell.Dev.Biol.* 30P:
150 181-186.

151 Korneva S. & Maribona, R.H. (1988) .ONITEM, Oficina de Patentes, RPI 96/88 , La
152 Habana, Cuba.

- 153 Korneva S. & Maribona, R.H. (1995). Cultivo en suspensión de embrioides somáticos de
154 la caña de azúcar. ONITEM Oficina de patentes, # 22378, La Habana, Cuba.
- 155 Korneva S., Mendoza J. y Piña, F. (2007). Informe técnico CIBE- ESPOL .Guayaquil, Ecuador.
- 156 Murashige T. & Skoog,T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with
157 tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15: 473 – 497.
- 158 Panis B., Thinh, NT., Escalant, J-V. & Sharrock S. (2001). Guías Técnicas INIBAP #5.
159 Crioconservacion de Germoplasma de Musa. p.34.
- 160 Schoofs H., Panis B., Strosse H., Mayo, A., López J., Roux N., Dolezei, J. & Swennen R.
161 (1999). Bottlenecks in the generation and maintenance of morphogenic banana cell
162 suspensions and plant regeneration via somatic embryogenesis there from. *INFOMUSA*, 8
163 (2): pp3-7.
- 164 Strosse, H., Van den Houwe, I. & Panis, B. (2004).Banana Cell and Tissue Culture -
165 Review.In:Banana Improvement:Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations.
166 S.Mohan Jain and Rony Swennen (eds.).Published by Science Publishers,Inc.,Enfield,NH, USA.
- 167 Swennen, R., Arinaitwe, G., Cammue, B.P.A., François, I., Panis, B., Remy, S., Sági, L.,
168 Santos, E., Strosse, H. & Van den Houwe, I. (2003). Transgenic approaches for resistance
169 to *Mycosphaerella* leaf spot diseases in *Musa* spp. Jacome L, Lepoivre P, Marin D, Ortiz R,
170 Romero R, Escalant J-V (ed.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status
171 and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot
172 diseases of bananas. San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, Montpellier, France:
173 209-238.

