

Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano

Hannelore Strosse, Régis Domergue,
Bart Panis, Jean-Vincent Escalant y François Côte



La misión de la **Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano** (INIBAP) es aumentar de manera sostenible la productividad del banano y el plátano cultivados por pequeños productores para el consumo doméstico y mercados locales y de exportación.

El programa tiene cuatro objetivos principales:

Organizar y coordinar un esfuerzo global de investigación sobre banano y plátano para el desarrollo, la evaluación y la diseminación de cultivares mejorados y para la conservación y utilización de la diversidad de las Musáceas;

Promover y fortalecer colaboraciones en la investigación relacionada con banano y plátano a los niveles nacional, regional e internacional;

Fortalecer la capacidad de los SNIA para conducir actividades de investigación y desarrollo sobre banano y plátano;

Coordinar, facilitar y apoyar la producción, recopilación y el intercambio de información y de documentación sobre banano y plátano.

INIBAP es un programa del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), un centro *Future Harvest*.

El **Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos** (IPGRI) es una organización científica internacional independiente que busca el avance en la conservación y uso de la diversidad fitogenética para el bienestar de las generaciones presentes y futuras. Es uno de los 16 Centros de Futura Cosecha apoyados por el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCAI), una asociación cuyos miembros provienen de los sectores privado y público los cuales apoyan los esfuerzos para promover los avances de la ciencia con el fin de reducir el hambre y la pobreza, mejorar la nutrición y la salud de las personas y proteger el ambiente. El IPGRI tiene su sede en Maccaresse, cerca de Roma, Italia, con oficinas en más de 20 otros países alrededor del mundo. El Instituto opera a través de tres programas: (1) el Programa de Recursos Fitogenéticos, (2) el Programa de Apoyo a los Recursos Genéticos del GCAI y (3) la Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano (INIBAP).

El estatus internacional del IPGRI es otorgado bajo un Acuerdo de Establecimiento el cual, para el mes de enero de 2003, fue firmado por los Gobiernos de Argelia, Australia, Bélgica, Benin, Bolivia, Brasil, Burkina Faso, Camerún, Chile, China, Chipre, Congo, Costa Rica, Côte d'Ivoire, Dinamarca, Ecuador, Egipto, Eslovaquia, Grecia, Guinea, Hungría, India, Indonesia, Irán, Israel, Italia, Jordania, Kenia, Malasia, Mauritania, Marruecos, Noruega, Pakistán, Panamá, Perú, Polonia, Portugal, República Checa, Rumania, Rusia, Senegal, Sudan, Suiza, Siria, Túnez, Turquía, Uganda y Ucrania.

El apoyo financiero para la investigación de IPGRI lo brindan más de 150 donantes, incluyendo a los gobiernos, fundaciones privadas y organizaciones internacionales. Para obtener más detalles sobre los donantes y actividades de investigación, por favor diríjase a los Informes Anuales de IPGRI, que están disponibles en forma impresa según solicitud a ipgri-publications@cgiar.org o en el sitio de Internet de IPGRI (www.ipgri.cgiar.org).

Las designaciones geográficas empleadas y el material presentado en esta publicación no implican que sea la expresión de opiniones por parte de IPGRI o de GCAI concernientes al estado legal de cualquier país, territorio, país o área o sus autoridades, o concernientes a la delimitación de sus fronteras o límites. De manera similar, los puntos de vista expresados son los de los autores y no necesariamente reflejan los puntos de vista de estas organizaciones.

La mención de un nombre de propietario no constituye la aprobación del producto y se presenta solo para la información.

Citación:

Strosse H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant y F. Côte. 2003. Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano (A. Vézina y C. Picq, eds). Guías técnicas INIBAP 8. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.

INIBAP ISBN: 2-910810-65-8

ISSN: 1560-3865

© International Plant Genetic Resources Institute, 2003

IPGRI
Via dei Tre Denari 472/a
00057 Maccaresse (Fiumicino), Rome, Italia

INIBAP
Parc Scientifique Agropolis II
34397 Montpellier Cedex 5, Francia



Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano

Hannelore Strosse¹, Régis Domergue²,
Bart Panis¹, Jean-Vincent Escalant³ y François Côte²

Editado por Anne Vézina³ y Claudine Picq³

¹ KULeuven, Laboratory of Tropical Crop Improvement,
Kasteelpark Arenberg 13, B-3001 Leuven, Bélgica

² Cirad, Biotrop laboratory, Avenue Agropolis,
34398 Montpellier Cedex 5, Francia

³ Inibap, Parc Scientifique Agropolis 2,
34397 Montpellier Cedex 5, Francia

Prefacio

Los protocolos estuvieron preparados por el *Laboratory of Tropical Crop Improvement* de la KULeuven y el laboratorio de biología celular del *Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement* (Cirad, laboratorio Biotrop).

Contenido

Introducción	5
1. Embriogénesis somática	6
Inducción de callos	6
Preparación del explante inicial	6
Inducción de embriogénesis	9
Formación de callos	10
Iniciación de las suspensiones celulares	11
Selección del callo embriogénico	11
Subcultivo y mejoramiento de la calidad	12
Mantenimiento de la suspensión celular	13
Regeneración de plantas	14
Desarrollo de embriones	14
Germinación de embriones	14
Regeneración en plántulas	15
2. Criterios de evaluación	21
Formación de callo ideal	21
Establecimiento de la suspensión de células embriogénicas	21
Formación de embriones	21
Capacidad de regeneración	21
3. Limitaciones de la embriogénesis somática	24
Condiciones de cultivo	24
Variación somaclonal	25
Bibliografía	26
Apéndice 1. Siglas	28
Apéndice 2. Medios de cultivo	29
Apéndice 3. Listas de cultivares para los cuales se obtuvieron callos embriogénicos o suspensiones de células embriogénicas	31

Introducción

Las técnicas de la embriogénesis somática fueron desarrolladas originalmente para lograr dos propósitos: la micropropagación masiva y el desarrollo de herramientas celulares para el mejoramiento genético (por ejemplo, la transformación genética y la fusión de protoplastos). Estas técnicas se basan en el uso de reguladores sintéticos de crecimiento (auxinas) para inducir la dediferenciación de los tejidos y formación de tejidos embriogénicos (callos). El callo proporciona el material de inicio para el desarrollo de suspensiones de células embriogénicas (SCE). Para estas suspensiones, embriones son producidos y plantas son regeneradas.

A pesar de su alta capacidad de regeneración, la técnica de producción de SCE no es operacional para la propagación masiva. La razón principal es una mayor variación somaclonal en comparación con la que se encuentra con la técnica de las puntas apicales. Sin embargo, las SCE son ya utilizadas en la transformación genética y la fusión de protoplastos. Las plantas regeneradas de las SCE originan habitualmente de una sola célula. En el caso de plantas transformadas, se escapa al problema de las plantas quimeras (es decir, plantas que contienen células genéticamente cambiadas junto con células no cambiadas), que se presenta cuando como material de inicio se utilizan puntas apicales.

Cuatro procedimientos fueron probados con plantas de banano, cada uno para diferentes tipos de explantes: embriones cigóticos (Cronauer y Krikorian 1988, Escalant y Teisson 1989), rebanadas de rizomas y vainas foliares (Novak *et al.* 1989), flores inmaduras masculinas o femeninas (Ma 1991, Escalant *et al.* 1994, Grapin *et al.* 1996, Grapin *et al.* 1998) y cultivos de meristemas proliferantes (escalpos) (Dhed'a *et al.* 1991, Schoofs 1997). Por lo general, las SCE se inician de las flores masculinas inmaduras o escalpos.

El desarrollo de un medio de cultivo y de una metodología para obtener SCE de las flores masculinas por el Profesor Ma en la Universidad de Taiwán (Ma 1991) fue un gran avance en el desarrollo de un sistema de embriogénesis somática para los bananos e inspiró numerosos estudios. Los primeros pasos, hasta la formación del callo embriogénico, están descritos en Escalant *et al.* (1994). Las descripciones de las fases de iniciación, mantenimiento y regeneración de las suspensiones celulares están disponibles en Grapin *et al.* (1996) y Côte *et al.* (1996). El método de Ma también ha sido utilizado con las flores femeninas inmaduras para aquellos cultivares que no producen flores masculinas (Grapin *et al.* 2000).

El método de escalpo utilizado en la *Katholieke Universiteit Lueven* (KULeuven) se basa en cultivos que proliferan rápidamente iniciados a partir de puntas apicales. Este método fue descrito por primera vez por Dhed'a (1992) y optimizado por Schoofs (1997).

En estas guías, se describen solo los métodos basados en las flores masculinas inmaduras y escalpos, ya que son corroborados por numerosas publicaciones y han sido repetidos en varios laboratorios. Los protocolos que describen estos métodos están seguidos por capítulos que detallan como evaluar las SCE de calidad y las limitaciones de esta técnica.

1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática de los bananos vía flores masculinas y escalpos, es ilustrada en la Figura 1 y detallada abajo. Los “explantes iniciales” se refieren a los explantes que se desarrollan en un callo embriogénico cuando son colocados en un medio para la inducción de callos. Dependiendo del método, el explante inicial es una flor inmadura o un escalpo derivado de una punta apical. Sin embargo, mientras que las flores inmaduras se recolectan directamente de la yema masculina, si se utiliza el método de escalpos, se necesita una fase de cultivo *in vitro* para obtener un explante inicial.

Dado que estos métodos difieren solo en los primeros pasos que llevan a la obtención del callo embriogénico, hasta este punto los protocolos se presentan paralelamente. Luego, se presenta un protocolo común en el cual se explican las particularidades para cada método.

Inducción de callos

Preparación del explante inicial

Método de escalpos

Método de flores inmaduras

Material de inicio

Como material de inicio se utilizan puntas apicales indexadas para la presencia de virus (Diekmann y Putter 1996). Ellas provienen de las plantas *in vitro* enraizadas (Figura 2), o de plantas de invernadero o campo que han sido esterilizadas superficialmente (Hamill et al. 1993).

Remueva las raíces y hojas y corte unos 0.5 cm sobre el meristema apical (Figura 3). El hacer las incisiones longitudinales puede mejorar la multiplicación de brotes individuales.

Use yemas masculinas (Figura 8) recolectadas de 1 a 10 semanas después del inicio de la floración. Las yemas pueden ser mantenidas por 24 horas antes de la inoculación de las flores inmaduras. Para los cultivares que no producen flores masculinas, como el plátano Cuerno (Horn), se puede usar flores femeninas. En este caso, la yema se toma desde adentro del pseudotallo antes de la floración. El método está descrito en Grapin et al. 2000.

En condiciones no esterilizadas, reduzca el tamaño de la yema masculina hasta que el explante sea de 0.8 cm x 2 cm (Figura 9). La yema reducida se mantiene en condiciones no deshidratantes hasta la esterilización, por ejemplo, en un contenedor con unas pocas gotas de agua y sellado con una película plástica.

Método de escalpos

Método de flores inmaduras

Esterilización

Realice el cribado para la presencia de bacterias de lento crecimiento. Aunque ellas generalmente no interfieren con la multiplicación de los brotes *in vitro*, las bacterias podrían ser problemáticas en las etapas posteriores de la iniciación de las suspensiones celulares. Corte una rebanada en la base del cormo y frótela en el medio bacteriológico. Incube a 28°C y de 4 a 6 semanas más tarde examine el medio de cultivo para la presencia de colonias bacterianas (Van den Houwe et al. 1998).

Las yemas reducidas se esterilizan superficialmente en alcohol etílico al 70% por 1 minuto (Figura 10). No es necesario enjuagarlas con agua destilada. El lapso de tiempo entre la desinfección e inoculación debe ser menor de 1 hora.

Inoculación

Inocule los explantes en 25 ml del medio P5 (Tabla 1 en Apéndice 2) en tubos de ensayo de 150 ml (1 explante por tubo de ensayo) o frascos de alimento infantil (de 3 a 5 explantes por frasco). Los explantes son cultivados bajo condición estándar: 27°C bajo una intensidad continua de luz de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o un fotoperíodo de 12 h y una humedad relativa superior al 70%.

Un mes más tarde, evalúe el material de inicio y seleccione el medio de proliferación que será utilizado para el subcultivo, dependiendo de la capacidad de proliferación del clon (para una descripción detallada de las diferentes clases de proliferación, vea Schoofs 1997).

Para los cultivares con una alta capacidad de proliferación (la mayoría de los cultivares pertenecientes al grupo ABB), un mes después de la inoculación en el medio P5, se deberían observar en la base del explante, racimos de brotes pequeños y grupos de hasta 20 meristemas muy apretados (Figura 4).

Ir a la sección «Inducción de embriogénesis».

Método de escalpos

Estos cultivares deben ser mantenidos en el medio P5 hasta la producción de cultivos de meristemas en forma de 'coliflor'.

Para los cultivares con capacidad de proliferación de moderada a baja (la mayoría de los bananos y plátanos), los grupos de brotes y plántulas enraizadas sin la formación del meristema en la base de la hoja, se formarán de 1 a 3 meses después de la inoculación en el medio P5 (Figura 5). Estos cultivares deben ser transferidos al medio P4 (Tabla 1 en Apéndice 2) para obtener cultivos de meristemas en forma de 'coliflor' (Figura 6).

Método de flores inmaduras

Subcultivo

Una vez al mes, seleccione pequeños brotes con grupos de meristemas en la base de la hoja hasta que los grupos alcancen unos 0.5 cm en diámetro y puedan ser cultivados separadamente. Las condiciones de cultivo, a las cuales se les referirá como a condiciones de cultivo 2 de aquí en adelante, son las mismas que las condiciones estándar mencionadas arriba, con la diferencia de que los cultivos se mantienen en la oscuridad.

Los cultivos de meristemas deben ser subcultivados hasta que se conviertan en racimos de pequeños meristemas blancos rodeados por unas pocas hojas muy pequeñas (Figura 6). El número requerido de subcultivos varía de un clon a otro, pero usualmente es entre 2 y 10. Las cantidades de ciclos requeridas y máximas son indicadas por Schoofs (1997) para un amplio rango de cultivares. Cuando la capacidad

Ir a la sección «Inducción de embriogénesis».

Método de escalpos

de proliferación disminuye después de subcultivos repetidos en el medio P4, se recomienda realizar 1 o 2 subcultivos en el medio P5 antes de reanudar los subcultivos en el medio P4.

Método de flores inmaduras

Inducción de embriogénesis

Material de inicio

Utilizando un microscopio binocular, corte escalpos de buena calidad (de 3 x 3 x 3 mm a 3 x 3 x 5 mm) de los cultivos de meristemas (Figura 7). Estos escalpos deben tener un alto ratio de domos meristemáticos / tejido foliar y de cormo. Se debe evitar la presencia de muchos tejidos foliares y de cormo, ya que el tejido del cormo tiende a aumentar y el tejido foliar da lugar a demasiada cantidad de callos acuosos.

Bajo una cubierta esterilizada, las flores masculinas inmaduras provenientes de yemas reducidas y esterilizadas superficialmente son aisladas utilizando un binocular (Figura 11). Las flores inmaduras deben tomarse de las posiciones de 16^a a 8^a (siendo 1 la flor inmadura más cercana al domo meristemático) (Figura 12). Use un escalpelo con hojas finas (por ejemplo, Feather No. 11).

Las flores en las posiciones de la 8^a a la 16^a son las que mejor responden en términos de embriogénesis. Las que se encuentran abajo tienden a convertirse necróticas en el medio MA1, mientras que las que están arriba tienden a producir callos no embriogénicos.

Inoculación

Los escalpos son inoculados en el medio semisólido ZZ (ZZss, Tabla 1 en Apéndice 2) en tubos de ensayo (1 explante por tubo de ensayo), frascos de alimento infantil o platos Petri (de 3 a 5 explantes por un plato Petri de 9 cm), bajo las condiciones de cultivo 2. La superficie cortada del escalpo se introduce en el medio de cultivo, asegurando que los domos meristemáticos no se encuentren en contacto directo con el medio de cultivo.

Las flores de las posiciones de la 8^a a la 16^a son cultivadas en el medio MA1 (Tabla 2 en Apéndice 2) en frascos de alimentos infantiles o en platos Petri de 9 cm (Figura 13). Los cultivos se mantienen en una oscuridad total bajo condiciones de alta humedad (>70% RH) a 27°C.

La superficie cortada está en contacto con el medio. Los contenedores son sellados con Parafilm® o papel de

Método de escalpos

Los contenedores son sellados con Parafilm® o papel de aluminio para evitar la evaporación y reducir la contaminación. Esto es de suma importancia, ya que los escalpos se mantienen en el mismo medio de cultivo durante la fase entera de inducción de la embriogénesis (de 3 a 8 meses).

Método de flores inmaduras

aluminio para evitar la evaporación (una humedad relativa baja reduce las posibilidades de éxito) y para reducir la contaminación. Esto es de suma importancia, ya que las flores masculinas se dejan en el mismo medio de cultivo durante la fase entera de inducción de la embriogénesis (de 4 a 7 meses).

Las siguientes secciones son válidas tanto para el método de escalpos como de flores inmaduras.

Formación de callos

Los cultivos deben ser revisados mensualmente durante los primeros 3 meses y después de este período, cada dos semanas. El proceso de la inducción de la embriogénesis depende del cultivar y del método utilizado, pero en general se pueden distinguir las siguientes fases.

- De 0 a 4 semanas:
 - Diferenciación del tejido foliar en callo acuoso (*método de escalpo*);
 - aparición de callo lesionado (*métodos de escalpo y de flor masculina*);
 - el explante de la flor masculina se enrolla y se vuelve casi circular.
- Alrededor de 4 semanas:
 - Aparición de los glóbulos meristemáticos en el explante (la mayor parte de la superficie se torna negra, un signo positivo que indica que se ha inoculado poca cantidad de tejido foliar).
- Desde la 6ª semana en adelante:
 - abultamiento del tejido del cormo (la parte baja del escalpo);
 - desarrollo de callos nodulares no embriogénicos secundarios de color amarillo (Figura 14) que no son apropiados para la iniciación de una suspensión;
 - formación de glóbulos heterogéneos;
 - formación de callos compactos (no embriogénicos) que no son apropiados para la iniciación de una suspensión (Figura 15);
 - desarrollo de callos embriogénicos (CE) que consisten de embriones individuales (Figura 16) o callos compactos (CC) (Figura 17) que no son apropiados para la iniciación de una suspensión. La frecuencia más alta de los CE usualmente se observa después de 3 meses de cultivo (*método de flores inmaduras*);

- formación de un callo embriogénico friable (llamado CI por “callo ideal”) que contiene muchos proembriones translúcidos (generalmente más de 10) (Figuras 18 y 19). El callo es apropiado para la transferencia a un medio líquido. La frecuencia más alta de los CI usualmente se observa después de 4 o 5 meses de cultivo (*método de flores inmaduras*). Ver Escalant *et al.* 1994 y Grapin *et al.* 1996 para la información sobre la histología de un CI.

- De 6 a 8 meses en adelante:

- los glóbulos y callos secundarios se tornan marrones.

- Al final del período de cultivo, se distinguen tres patrones principales de desarrollo:

- no existe respuesta embriogénica (del 50 al 100% de los explantes dependen del cultivar y del método);

- callos embriogénicos que consisten de embriones individuales (en promedio, el 15% de las flores masculinas inoculadas);

- callos embriogénicos friables “ideales” (en promedio, 0.8% de flores masculinas inoculadas u 8% de brotes masculinos si se inoculan 10 flores masculinas inmaduras por yema masculina).

Ver sección 2, “Criterios de evaluación”, para obtener más información sobre como calcular la tasa de éxito de formación de callos embriogénicos.

Iniciación de las suspensiones celulares

Selección del callo embriogénico

La tasa de éxito de la iniciación de una suspensión de células embriogénicas (SCE) de buena calidad depende de la calidad y volumen de los callos embriogénicos seleccionados, como lo determina la presencia de solo unos pocos embriones desarrollados. Una observación cuidadosa y regular del callo CI es necesaria para seleccionar callos embriogénicos en los que el “tamaño correcto” y la “fase de desarrollo correcto” estén en equilibrio.

Seleccione tejidos que contengan callos muy embriogénicos y proembriones transparentes en la etapa temprana. Es importante remover los embriones en la etapa de cotiledones, glóbulos meristemáticos y callos compactos.

Transfiera el CI al medio de cultivo: ZZ líquido (ZZL, Tabla 1 en Apéndice 2) en el caso del CI derivado de los escalpos, o MA2 líquido (Tabla 2 en Apéndice 2) en el caso del CI derivado de flores masculinas.

Se puede utilizar diferentes tipos de contenedores con tal de que se respete una mínima densidad de inóculo.

- Frasco Erlenmeyer: 1 complejo embriogénico por frasco, de 3 a 6 ml de medio de cultivo ZZ1 por frasco. El complejo embriogénico debe cubrir dos tercios del frasco.
- Un plato con varias cavidades (1 callo embriogénico por cavidad, cada cavidad de 3 cm de diámetro, de 6 a 8 ml de MA2 líquido por cavidad).

Cubra el contenedor con papel aluminio, séllelo con Parafilm® y colóquelo en un vibrador rotatorio (de 70 a 100 rpm) bajo las condiciones estándar 2.

Los IC son friables y se desprenden en pedazos inmediatamente en el medio líquido.

Subcultivo y mejoramiento de la calidad

El objetivo es mejorar la calidad de las suspensiones con el fin de obtener SCE homogéneas. Para la observación se utiliza un microscopio invertido. Cuando se dispone de suficiente material, se puede tomar una muestra para la observación bajo un microscopio de luz. Todos los componentes no deseados son removidos utilizando una pipeta.

De 0 a 3 meses después de la iniciación

Las SCE recién establecidas (Figura 20) están compuestas de:

- agregados de células embriogénicas;
- glóbulos heterogéneos que liberan racimos de células embriogénicas en su superficie;
- diferentes embriones pequeños transparentes que producen células embriogénicas cerca de su base (Figura 21);
- glóbulos meristemáticos amarillentos vacíos o células densas ricas en almidón (Figura 22);
- embriones blancuzcos en la etapa cotiledonaria que se diferencian en glóbulos meristemáticos o liberan compuestos fenólicos que se oxidan causando el ennegrecimiento de la suspensión celular.

Refresque una parte del medio de cultivo cada 7 o 10 días. Dependiendo de la tasa de crecimiento de las SCE, mantenga de 10 a 20% del medio preacondicionado antiguo.

Remueva los glóbulos meristemáticos amarillentos, los embriones blancuzcos en la etapa cotiledonaria, el tejido necrótico y las células altamente vacuoladas.

Cada mes, transfiera una muestra a un medio bacteriológico (Van den Houwe 1998).

Transfiera las SCE a un contenedor más grande dependiendo de la tasa de crecimiento del volumen celular establecido de la suspensión.

3 meses después de la iniciación hasta el establecimiento de la suspensión celular (del 6° al 9° mes)

Una SCE de 3 meses de edad está compuesta de:

- agregados de células embriogénicas proliferantes;

- proembriones somáticos blancuzcos resultantes de la diferenciación de las células embriogénicas;
- glóbulos meristemáticos amarillentos resultantes de la conversión de los glóbulos heterogéneos;
- células densas aisladas blancuzcas liberadas por los glóbulos meristemáticos;
- células altamente vacuoladas liberadas por los glóbulos meristemáticos.

Para evaluar la viabilidad de las SCE, añada unas pocas gotas de diacetato fluoresceína FDA (-20°C, disuelto en agua y acetona) al agua destilada hasta observar un brillo azul. Añada 1 o 2 gotas de este caldo diluido a una muestra de suspensión. Los tejidos viables brillan con un color verde fluorescente cuando se observan bajo una luz ultravioleta.

Cuando el volumen es suficiente, se extiende una cantidad muy pequeña de células sobre el medio de regeneración lo que constituye una vía rápida y sencilla para determinar el carácter embriogénico de la suspensión.

Refresque parte del medio de cultivo cada 10 a 14 días. Dependiendo de la tasa de crecimiento de las SCE, mantenga de 10 a 20% del medio antiguo preacondicionado.

El volumen de células establecido al principio de un subcultivo debe ser de 1.5 a 3%. Utilice un frasco Erlenmeyer más grande o divida el contenido entre varios frascos Erlenmeyer si es necesario.

Remueva los glóbulos meristemáticos y proembriones cuando ellos estén presentes en grandes volúmenes. Remueva los racimos de células grandes mediante colado, reteniendo fracciones de entre 250 y 500 μm .

Cada mes, transfiera una muestra a un medio bacteriológico.

Mantenimiento de la suspensión celular

Aunque es relativamente fácil obtener la multiplicación de las células de banano en un medio líquido, las suspensiones resultantes pueden tener capacidades regenerativas diferentes. Una descripción histológica detallada de diferentes partes de una SCE, de su desarrollo en el tiempo y sus potencial embriogénico se puede encontrar en Georget *et al.* 2000.

Una SCE de buena calidad tiene las siguientes características:

- presencia de una alta proporción (>80%) de agregados de células embriogénicas proliferantes (Figura 23);
- color, que generalmente varía de amarillo brillante a pálido (las suspensiones de color blanco pálido no son deseables, ya que a menudo esta es una indicación de la presencia de una alta proporción de células no regenerables ricas en almidón);
- una rápida (dentro de 1 minuto) precipitación de células cuando la suspensión es removida del vibrador orbital, indicando una alta densidad del contenido celular;

- una viabilidad de los racimos de células embriogénicas que supera el 80% de acuerdo a la prueba de FDA;
- una tasa de multiplicación entre 1.5 y 2 por un período de subcultivo de dos semanas;
- una alta capacidad de regeneración, es decir, de 100 a más de 300 000 embriones por ml de células establecidas.

Verifique regularmente para detectar la contaminación y revise la capacidad de regeneración (ver abajo la sección sobre la regeneración de las plantas) y la tasa de crecimiento. Para la última, se puede considerar los siguientes parámetros:

- volumen de células establecidas (SCV) (precipitación por gravedad);
- volumen celular aglomerado (PCV) (precipitación por centrifugación);
- peso fresco y seco.

La calidad de una SCE disminuye con el número de subcultivos. Esto produce como resultado una creciente probabilidad de contaminación y una disminuida tasa de crecimiento y capacidad de regeneración, debido, por ejemplo, a la invasión de las células densas de rápido crecimiento ricas en almidón (Georget *et al.* 2000). También se espera una relación directa entre el tiempo de cultivo y variación somaclonal. Para reducir los problemas relacionados con el subcultivo, se desarrolló un protocolo de crioconservación que hace posible el almacenamiento de las SCE durante tiempo ilimitado (Panis y Think 2001).

Regeneración de plantas

Una SCE de buena calidad se regenera fácilmente en embriones somáticos y, por consiguiente, en plantas.

Desarrollo de embriones

Al inicio de un período de subcultivo:

- transfiera una muestra representativa de SCE a un cilindro graduado y ajuste el SCV a 3% añadiendo el medio líquido de mantenimiento: ZZ1 (*método de escalpos*) o MA2 (*método de flores inmaduras*) (Figura 24);
- transfiera 1 ml de esta solución a un papel de filtrado Whatman en un plato Petri de 90 mm que contiene 25 ml de medio de regeneración: RD1 (*método de escalpos*) o MA3 (*método de flores inmaduras*);
- incube bajo condiciones estándar 2.

De uno a tres meses después de la iniciación, dependiendo de las SCE, los embriones en desarrollo deben verse tal como se muestra en la Figura 25.

Germinación de embriones

Transfiera una muestra de embriones maduros (de 3 a 4 meses después de estar en el medio de regeneración) a un plato Petri que contiene 25 ml de medio de germinación: RD2 (*método de escalpos*) o M4 (*método de flores inmaduras*). Incube bajo condiciones estándar durante 1.5 meses para obtener embriones germinados (Figura 26).

Regeneración en plántulas

Transfiera los embriones germinados al medio P6. Incube bajo condiciones estándar durante 1 a 1.5 meses. En esta etapa, las plántulas se parecen a aquellas obtenidas utilizando el método clásico *in vitro* (Figura 27).

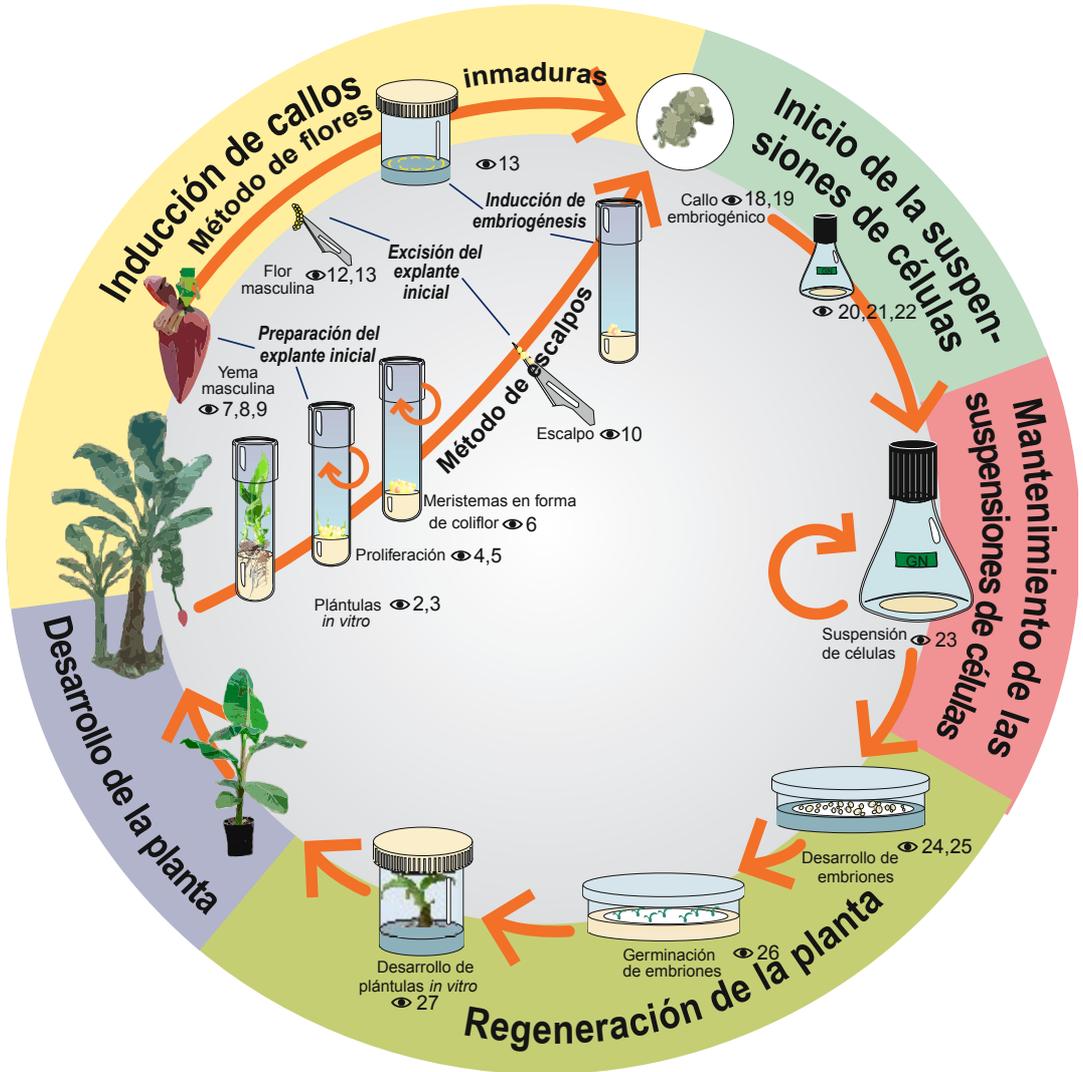


Figura 1. Etapas de los dos principales métodos utilizados para producir SCE de bananos y plátanos.

👁 Referencia a las figuras.

Método de escalpos



Figura 2. Plantas *in vitro* enraizadas.



Figura 3. Explante inicial.

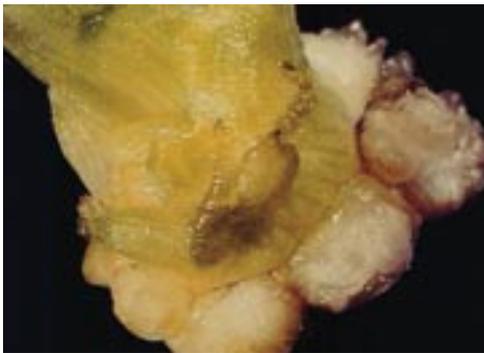


Figura 4. Cultivares con una alta capacidad de proliferación (1 mes después de la inoculación).



Figura 5. Cultivares con capacidad de proliferación de moderada a baja (1 a 3 meses después de la inoculación).



Figure 6. Cultivos de meristemas.

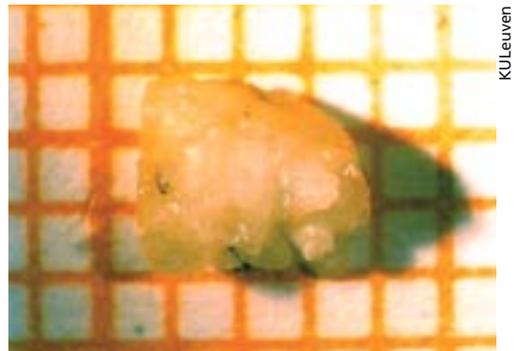


Figura 7. Escalpos cortados de los cultivos de meristemas.

Método de flores inmaduras



Régis Domergue, Cirad

Figura 8. Yemas masculinas.



Régis Domergue, Cirad

Figura 9. Preparación del explante inicial.



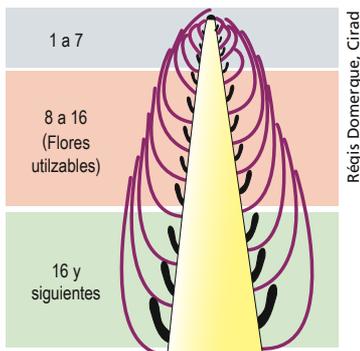
Régis Domergue, Cirad

Figura 10. Yemas esterilizadas superficialmente.



Régis Domergue, Cirad

Figura 11. Aislamiento del explante inicial.



Régis Domergue, Cirad

Figura 12. Ubicación de las flores en la yema masculina.



Figura 13. Inoculación de las flores masculinas.

Callos



KULeuven

Figura 14. Callo nodular no embriogénico de color amarillo.



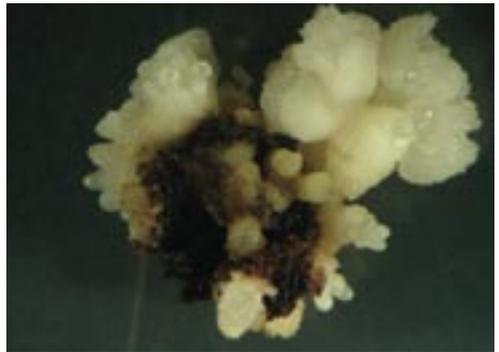
KULeuven

Figura 15. Callo compacto (no embriogénico).



KULeuven

Figura 16. Embriones individuales.



Régis Domergue, Cirad

Figura 17. Embriones y callo compacto.



Régis Domergue, Cirad

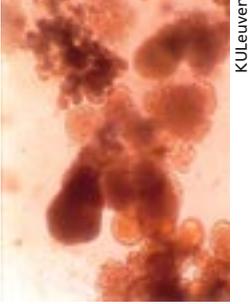
Figura 18. Callo ideal.



KULeuven

Figura 19. Callo ideal con proembriones translúcidos.

Suspensiones de células y regeneración



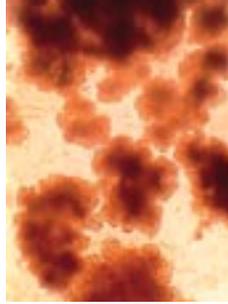
KULeuven

Figura 20. SCE recién establecidas.



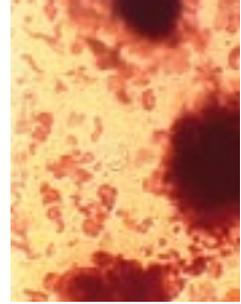
KULeuven

Figura 21. Embriones transparentes.



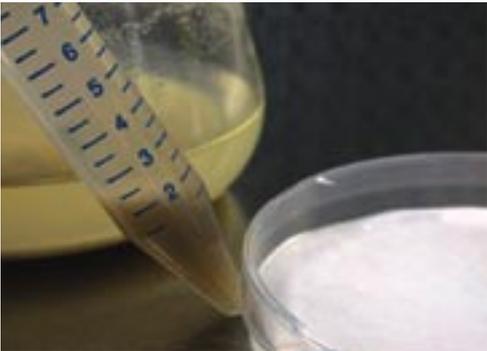
KULeuven

Figura 22. Glóbulos meristemáticos amarillentos.



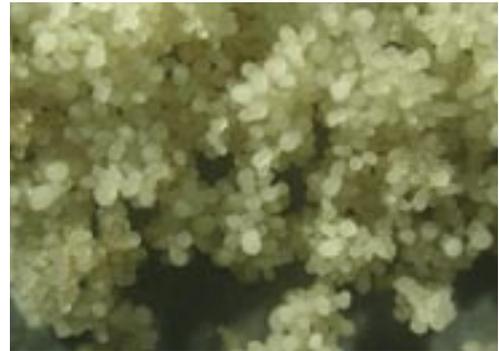
KULeuven

Figura 23. Agregados de células embriónicas proliferantes.



Régis Domergue, Cirad

Figura 24. Subcultivos de SCE.



Régis Domergue, Cirad

Figura 25. Embriones en desarrollo.



Régis Domergue, Cirad

Figura 26. Embriones germinados.



Régis Domergue, Cirad

Figura 27. Plántulas regeneradas.

2. Criterios de evaluación

Se necesitan criterios comunes para evaluar el desempeño de la técnica utilizada y facilitar el intercambio de información entre los equipos que trabajan en la embriogénesis somática de los bananos. A continuación se presenta una selección de indicadores cualitativos y cuantitativos que cubren los pasos principales.

Formación de callo ideal

Método de escalpos

% de CI = número de CI/número de escalpos inoculados

Método de flores inmaduras

% de CI = número de CI/número de yemas masculinas inoculadas

El valor obtenido para 'Grande naine' generalmente está entre 3 y 10%, utilizando el método de escalpos, y 8% en promedio, utilizando el método de flores inmaduras. Sin embargo, los valores para los dos métodos no son comparables, ya que son las flores inmaduras las que se inoculan en la yema masculina y no la propia yema masculina.

Establecimiento de la suspensión de células embriogénicas

% de SCE iniciadas = número de SCE/número de CI colocados en el medio líquido

Este porcentaje se encuentra entre 10 y 30% con 'Grande naine' (Domergue y colegas resultados no publicados).

Una SCE de buena calidad esta formada de agregados celulares homogéneos. Esta homogeneidad se observa después de muchos meses de cultivo (generalmente de 6 a 9 meses). Una SCE puede ser caracterizada mediante un aumento mensual en el volumen de células establecidas, que usualmente está entre 1.5 y 4. Una vez establecida, una SCE puede ser mantenida multiplicándose por meses, hasta años.

Formación de embriones

La cantidad de embriones obtenidos por volumen de células establecidas es el criterio clave mediante el cual se evalúa la calidad de una suspensión. Por ejemplo, 1 ml de células establecidas puede rendir de 100 a 300 000 embriones (Grapin *et al.* 1996, Côte *et al.* 1996, Strosse *et al.* en imprenta).

Tasa de éxito de formación de embriones = número de embriones/ml de células establecidas

Capacidad de regeneración

Para describir el proceso de regeneración a menudo se utiliza el éxito de la germinación. Diferentes equipos han reportado valores de hasta 80%. Más allá de la variabilidad que es explicada por el uso de diferentes metodologías, el rango de

los resultados observados refleja también probablemente la dificultad para estimar la cantidad de embriones. Sugerimos los siguientes criterios.

% de germinación = número de plántulas obtenidas/número de embriones colocados en el medio de germinación

Otra vía para evaluar el desempeño del proceso de regeneración es calcular la capacidad de regeneración.

Capacidad de regeneración = número de vitroplantas producidas /ml de células establecidas

Con 'Grande naine' se observaron valores por el orden de 35 000 plántulas/ml de células establecidas (Georget y colegas datos sin publicar, Strosse *et al.* en imprenta).

Para determinar la capacidad de regeneración de una suspensión, es necesario realizar un ensayo cuantitativo. El siguiente método está basado en el peso y cantidad de embriones en germinación y de las plantas de muestras representativas.

- Determine el peso total del cultivo de células regeneradas, es decir, el peso de los embriones (sea cuidadoso conservando solo los embriones).
- Recoja tres muestras representativas del cultivo de células, péselas y cuente el número de embriones en cada una de ellas.
- Tome tres muestras representativas, péselas y transfiera cada una de ellas a un tubo de ensayo (*método de escalpos*) o un plato Petri de 90 mm (*método de flores inmaduras*) que contengan medios de germinación: 12 ml de RD2 (*método de escalpos*) o 25 ml de M4 (*método de flores inmaduras*).
- Incube bajo las condiciones estándar.
- 1.5 meses después de la iniciación de la germinación:
 - determine el número promedio de brotes verdes;
 - transfiera los brotes verdes en el medio de enraizamiento MS (aproximadamente 3 ml por planta);
 - incube bajo las condiciones estándar.
- De 1.5 a 2 meses después de la iniciación del enraizamiento en el MS:
 - determine la cantidad promedio de brotes enraizados.

Estos datos se utilizan para determinar el número total de embriones o brotes enraizados obtenidos de una cantidad específica de suspensión celular. Por ejemplo, el número de plantas regeneradas por ml de células establecidas de SCE de Cavendish puede ser mayor a 10 000. En experimentos a gran escala se observó un promedio de 35 000 plántulas enraizadas /ml de células establecidas (Georget y colegas datos no publicados).

En el Apéndice 3 se presenta una lista de cultivares en los cuales el método de escalpos o el método de flores inmaduras dieron resultados positivos. Los resultados provienen de los laboratorios de los autores.

3. Limitaciones de la embriogénesis somática

Aunque la embriogénesis somática en banano está bien establecida y se dispone de técnicas estándar, la iniciación de una SCE aún no puede considerarse como un procedimiento común (Schoofs *et al.* 1999). Esto se debe principalmente a la baja respuesta embriogénica de los tejidos de banano, a un largo período de tiempo necesario para obtener una suspensión de células embriogénicas, al riesgo de la variación somaclonal y a la ocurrencia de la contaminación.

El principal problema de utilizar los bananos comestibles (y por lo tanto sin semillas) consiste en que las células embriogénicas deben ser iniciadas de los tejidos diferenciados y no, como en el caso de la mayoría de las monocotiledóneas, de los tejidos generadores como los embriones cigóticos. Como consecuencia, es necesario iniciar cientos de explantes (flores o escalpos) para obtener un callo embriogénico de buena calidad. Además, el tiempo que se requiere entre la inoculación del explante en el medio de inducción y el establecimiento de una suspensión de buena calidad es relativamente prolongado: entre 7 y 14 meses. En el caso del método de escalpos, es necesario añadir un período para la preparación de los escalpos que es de 3 a 14 meses, dependiendo del cultivar.

Condiciones de cultivo

Una importante consecuencia de esta baja respuesta embriogénica reside en que la optimización del medio de cultivo es muy difícil. Se necesita una organización experimental elaborada y laboriosa. Esta es probablemente la principal razón del porqué los medios de cultivo ZZ y MA1 utilizados para la inducción de la embriogénesis somática no han cambiado durante la última década, a pesar de la necesidad de optimizar los medios para ciertos cultivares.

Las siguientes son algunas sugerencias para optimizar la embriogénesis somática en bananos.

- Optimización del material de inicio (tamaño, estado osmótico...).
 - Cambio de la condición osmótica del medio de cultivo.
 - Cambio de las concentraciones de las auxinas que son responsables por el crecimiento no organizado de las células embriogénicas.
 - Adición de los compuestos que inducen la embriogénesis como aminoácidos y poliaminas.
 - Cambio de las condiciones fisiológicas (pH, temperatura...).
 - Aplicación de cultivos de alimento.
 - Establecimiento de un procedimiento para obtener callos embriogénicos basándose en el uso sucesivo de dos medios de cultivo (choque de auxinas).
-

La embriogénesis somática, como la mayoría de las técnicas *in vitro*, se basa en los resultados experimentales. La investigación fundamental utilizando técnicas de biología molecular puede conducir a avances en la metodología.

Variación somaclonal

Pocos estudios fueron publicados sobre la incidencia de los tipos anormales entre las plantas de banano producidas a través de la embriogénesis somática. En 'Grande naine' se observó que un número de plantas derivadas de las suspensiones de células embriogénicas de 4 meses de edad fueron normales y tenían características agronómicas comparables con las plántulas *in vitro* (Côte *et al.* 2000a). Descubrimientos similares se obtuvieron con las plantas 'IRFA 903' derivadas de las suspensiones celulares de 7 meses de edad (Côte *et al.* 2000b). Estos datos sugieren que la embriogénesis somática puede ser utilizada para la transformación genética dado que una alta proporción de variantes puede ser aceptada para este propósito.

Sin embargo, no está claro si la embriogénesis somática puede ser utilizada para la propagación masiva de las plantas de banano. Los resultados disponibles se obtuvieron en suspensiones bastante jóvenes (de 4 a 7 meses), pero ya que solo un pequeño número de plantas puede actualmente ser regenerada de estas suspensiones, esta técnica no puede ser utilizada para la multiplicación a gran escala. Además, los resultados no publicados indican un aumento en la variación somaclonal al aumentar el tiempo de cultivo. En 'Grande naine' se observaron proporciones que variaban entre 15 y 100% de variantes somaclonales, después de 15 meses de cultivo (Côte y colegas datos no publicados).

Muchos equipos están buscando marcadores moleculares de variación somaclonal. Estos marcadores ayudarían a comprender como se genera la variación somaclonal e identificar los factores que influyen sobre su desarrollo. Los datos provenientes de la citometría de flujo también ayudarían a comprender mejor como las técnicas de la embriogénesis somática generan variantes somaclonales (Roux *et al.* en imprenta).

La preocupación sobre la variación somaclonal también se extiende a la crioconservación que se utiliza al conservar suspensiones de células embriogénicas. Côte *et al.* (2000b) criaron plantas recuperadas de suspensiones de células embriogénicas crioconservadas para verificar su estado normal. Ellos no observaron diferencias en el desempeño agronómico entre las plantas regeneradas de las SCE crioconservadas y las plantas testigo. Una SCE crioconservada también debe retener sus características (como su capacidad de transformación). Recientemente, se observaron niveles comparables de expresión transitoria y transformación estable utilizando las SCE de los bananos que fueron crioconservados y las SCE de los bananos que no lo fueron (Panis *et al.* en imprenta).

Bibliografía

- Côte F.X., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson & J.V. Escalant. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiologia Plantarum* 97:285-290.
- Côte F.X., M. Folliot, R. Domergue & C. Dubois. 2000a. Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grande naine). *Euphytica* 112:245-251.
- Côte F.X., O. Goue, R. Domergue, B. Panis & C. Jenny. 2000b. In-field behavior of banana plants (*Musa* spp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *Cryo-letters* 21:19-24.
- Cronauer S.S. & A.D. Krikorian. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Rep* 7:23-25.
- Dhed'a D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke & E. De Langhe. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
- Dhed'a D. 1992. Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et régénération en plantules par embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.). PhD thesis, KULeuven, Belgium. 171pp.
- Diekmann M. & C.A.J. Putter. 1996. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm. No.15. *Musa*. 2nd edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 29pp.
- Escalant J.V. & C. Teisson. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Rep* 7:181-186.
- Escalant J.V., C. Teisson & F.X. Côte. 1994. Amplified Somatic Embryogenesis from male flowers of triploid Banana and plantain cultivars (*Musa* sp). *In Vitro Cell Biol Devpmt.* 30:181-186.
- Escalant J.V., M. Dufour & B. Rabot. 1996. Plant genetic engineering in CATIE. Unidad de biotecnología. CATIE. Informe bianual 1994-1995. 2pp.
- Georget R., R. Domergue, N. Ferrière & F.X. Côte. 2000. Morpho-histological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Report* 19:748-754.
- Grapin A., J. Schwendiman & C. Teisson. 1996. Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* 32:66-71
- Grapin A., J.L. Ortíz, T. Lescot, N. Ferrière & F.X. Côte. 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain (*Musa* AAB). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61:237-244.
- Grapin A., J.L. Ortiz, R. Domergue, J. Babeau, S. Monmarson, J.V. Escalant, C. Teisson & F.X. Côte. 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.
- Hamill S.D., S.L. Sharrock & M.K. Smith. 1993. Comparison of decontamination methods used in the initiation of banana tissue cultures from field-collected suckers. *Plant Cell and Organ Culture* 33:343-346.
- INIBAP. 2000. Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 1999. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.

- Ma S.S. 1991 Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. Pp. 181-188 *In* Proceedings of Symposium on Tissue culture of horticultural crops, Taipei, Taiwan, 8-9 March 1988.
- Morel G. & R.H. Wetmore. 1951. Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany* 38:138-140.
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Novak F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Confer & T. Xiolang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology* 46:125-135.
- Panis B. & N.T. Thinh. 2001. Crioconservación de germoplasma de *Musa*. Guías Técnicas de INIBAP 5 (J.V. Escalant & S. Sharrock, eds). Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia. 44pp.
- Panis B., H. Strosse, S. Remy, L. Sági & R. Swennen. *In press*. Cryopreservation of banana tissues: support for germplasm conservation and banana improvement. *Banana Improvement: Cellular and Molecular Biology, and Induced Mutations*.
- Roux N., H. Strosse, A. Toloza, B. Panis & J. Dolezel. *In press*. Detecting ploidy level instability of banana embryogenic cell suspension cultures by flow cytometry. *Banana Improvement: Cellular and Molecular Biology, and Induced Mutations*.
- Schenk R.U. & A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous Plant Cell Cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. PhD thesis, KULeuven, Belgium. 257pp.
- Schoofs H., B. Panis, H. Strosse, A. Mayo Mosqueda, J. Lopez Torres, N. Roux, J. Dolezel & R. Swennen. 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.
- Strosse H., I. Van den Houwe & B. Panis. *In press*. Banana cell and tissue culture - review. *Banana Improvement: Cellular and Molecular Biology, and Induced Mutations*.
- Van den Houwe I., J. Guns & R. Swennen. 1998. Bacterial contamination in *Musa* shoot tip cultures. *Acta Horticulturae* 490:485-492.
-

Apéndice 1. Siglas

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

BA, BAP: 6-benzilaminopurina

CC: callo compacto

CE: callo embriogénico que contiene solo unos pocos embriones

CI: callo ideal adecuado para la iniciación de una SCE

FDA: diacetato fluoresceína

AIA: ácido indoleacético

MA1: medio de inducción del callo embriogénico para el método de flores inmaduras

MA2: medio de cultivo de suspensión celular

MA3: medio para el desarrollo de los embriones

MA4: medio para la germinación de los embriones

PCV: volumen celular aglomerado

P6: MS medio complementado con 1 μM de IAA y 1 μM de BAP

P5: MS medio complementado con 1 μM de IAA y 10 μM de BAP

P4: MS medio complementado con 1 μM de IAA y 100 μM de BAP

RD1: ZZss complementado con 100 $\mu\text{g/L}$ de Mio-inositol y desprovisto de fitoreguladores de crecimiento

RD2: RD1 complementado con 1 μM de BAP

RH: humedad relativa

SCE: suspensión de células embriogénicas

SCV: volumen celular establecido

ZZI: medio MS líquido de potencia media complementado con 5 μM de 2,4-D y 1 μM de zeatina

ZZss: ZZI semisolidificado con 3 g/L de Gelrita

Apéndice 2. Medios de cultivo

Tabla 1. Composición de los medios de cultivos utilizados en la embriogénesis somática de *Musa spp.* (*Método de escalpos*)

	P6	P5	P4	ZZss	ZZI	RD1	RD2
Macroelementos	MS	MS	MS	½ MS	½ MS	½ MS	½ MS
Oligoelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Acido ascórbico (mg/L)	10	10	10	10	10	10	10
Mio-inositol (mg/L)						100	100
AIA (mg/L)	0.175	0.175	0.175				
BAP (mg/L)	0.227	2.273	22.73				0.227
2,4-D (mg/L)				1	1		
Zeatina (mg/L)				0.219	0.219		
Sacarosa (g/L)	30	30	30	30	30	30	30
Agente de gelificación (Gelrita) (g/L)	3	3	3	3		3	3
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo MA (en referencia a la investigación del Dr Ma) que se utilizan en la embriogénesis somática de *Musa spp.* (*método de flores inmaduras*)

	MA1 Callogénesis	MA2 Multiplicación	MA3 Regeneración	MA4 Germinación
Macroelementos	MS	MS	SH	MS
Oligoelementos (exceptuando el hierro)	MS	MS	SH	MS
FeEDTA	+	+	+	+
Vitaminas*	MA	MA	MA	Morel
AIA (mg/L)	1			2
2,4-D (mg/L)	4	1		
NAA (mg/L)	1		0.2	
Zeatina (mg/L)**			0.05	
2iP (mg/L)			0.2	
Kinetina (mg/L)			0.1	
BAP (mg/L)				0.5
Sacarosa (mg/L)	30	45	45	30
Lactosa (g/L)			10	
Aminoácidos (mg/L)	Glutamina 100 g/L	Glutamina 100 g/L	Glutamina 100 g/L Prolina 230 g/L	
Extracto de malta (mg/L)	100	100	100	
Agente de gelificación (g/L)	Agar Tipo II 7 g/L		Fitagel 4 g/L	Fitagel 3 g/L
pH	5.7	5.3	5.8	5.8

* Ver tablas 3 y 4.

** Filtrar (0.2 µm), autoclavar y añadir cuando la temperatura de medio baje a 50°C.

Tabla 3. Composición de las vitaminas del medio Ma (Ma 1991)

	Concentración (mg/L)
Biotina	1
Glycina	2
Mio-inositol	100
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1

Tabla 4. Composición de las vitaminas del medio Morel (Morel y Wetmore 1951)

	Concentración (mg/L)
Biotina	0.01
Pantotenato de calcio	1
Mio-inositol	100
Acido nicotínico	1
Piridoxina HCl	1
Tiamina HCl	1

Apéndice 3. Listas de cultivares para los cuales se obtuvieron callos embriogénicos o suspensiones de células embriogénicas

Tabla 5. Cultivares para los cuales se obtuvieron callos embriogénicos (CI) o suspensiones de células embriogénicas (SCE) utilizando el método de flores inmaduras

Cultivar	Grupo genético	CI	SCE	Referencia
Col. 49	AA	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1998
SF 265	AA	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1998
IRFA 903	AA	X	X	Côte <i>et al.</i> 2000b
Grande naine	AAA	X	X	Escalant <i>et al.</i> 1996, Côte <i>et al.</i> 1996
Gros Michel	AAA	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1998
Yangambi km 5	AAA	X	No examinados	Grapin <i>et al.</i> 1998
French sombre	AAB	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1996
Dominico	AAB	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1998
Mysore	AAB	X	No examinados	Grapin <i>et al.</i> 1998
Silk	AAB	X	No examinados	Grapin <i>et al.</i> 1998
Curare	AAB	X*	X	Grapin <i>et al.</i> 2000
Curare enano	AAB	X*	X	Grapin <i>et al.</i> 2000
FHIA-01	AAAB	X		Grapin <i>et al.</i> 1998
FHIA-02	AAAB	X		Grapin <i>et al.</i> 1998

* Flor femenina.

Tabla 6. Cultivares para los cuales se obtuvieron callos embriogénicos (CE/CI) o suspensiones de células embriogénicas (SCE) utilizando el método de los escalpos

Cultivar	Grupo genético	CE	CI	SCE	Referencia
Calcutta 4	AA	X			No publicado
Kamaramasenge	AB	X	X	X	Schoofs 1997
Kisubi	AB	X			Schoofs 1997
<i>Musa balbisiana</i> 'tani'	BB	X			Schoofs 1997
Grande naine	AAA	X	X	X	Schoofs 1997, Strosse <i>et al.</i> en imprenta
Highgate	AAA	X			Schoofs 1997
Williams	AAA	X	X	X	Schoofs 1997, Strosse <i>et al.</i> en imprenta
Igitsiri	AAAh	X			Schoofs 1997
Agbagba	AAB	X		X	Strosse <i>et al.</i> en imprenta
Bise egome	AAB	X	X	X	Schoofs 1997
Lady finger	AAB	X			Schoofs 1997
Prata	AAB	X			Schoofs 1997
Orishele	AAB	X	X	X	Strosse <i>et al.</i> en imprenta
Three hand planty	AAB	X	X	X	Schoofs 1997
Bluggoe	ABB	X	X	X	Dhed'a 1991
Cardaba	ABB	X			Dhed'a 1992
Saba	ABB	X		X	Dhed'a 1992
Obino l'ewai	AAB	X		X	INIBAP 2000

