

## Comparación entre dos métodos de establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*)

Borys Chong\*, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes, Idalmis Bermúdez-Carballoso, Jorge Gallardo-Colina, Marisol Freire-Seijo, Laisyn Posada-Pérez, Idalia Herrera. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e. mail: boris@ibp.co.cu

### RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de comparar suspensiones celulares embriogénicas obtenidas mediante el cultivo de agregados florales masculinos del cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa AAA*) directamente en medios de cultivo líquido y suspensiones celulares obtenidas a partir de callos con estructuras embriogénicas del mismo cultivar. Los resultados demostraron que es posible el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas homogéneas a partir de estos explantes, los mejores resultados se obtuvieron con el agregado floral de rango ocho. Al comparar las suspensiones obtenidas por ambas metodologías, no se obtuvieron diferencias en cuanto al crecimiento de las suspensiones celulares, la formación de embriones y la germinación de estos. Sin embargo, la metodología propuesta en este trabajo para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar de banano 'Grande naine', fue más rápida y con un mayor porcentaje de establecimiento que la propuesta a partir de callos con estructuras embriogénicas.

Palabras clave: callos, embriones somáticos, medio de cultivo líquido

### ABSTRACT

Comparison of two methods for the establishment of embryogenic cell suspensions obtained from the culture of male flower directly in liquid culture medium and embryogenic callus of banana cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) was studied in this work. Establishment of homogeneous embryogenic cell suspensions from the culture of both explants in liquid medium was achieved though floral bud range eight showed the best results. Differences in the growing of cell suspension, somatic embryos formation and germination was not observed when the suspensions were compared. Nevertheless the methodology proposed in this work was faster than the 'callus' methodology and percentage of establishment was higher.

Key words: callus, liquid culture medium, somatic embryos

### INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática en el género *Musa* tiene dos objetivos principales: el desarrollo de técnicas de propagación *in vitro* y un sistema de regeneración a nivel celular útil para la transformación genética e hibridación somática (Georget *et al.*, 2000).

La embriogénesis somática en plátanos y bananos se ha obtenido de diferentes tipos de explantes, tales como: embriones cigóticos (Cronauer y Krikorian, 1988; Escalant y Teisson, 1989; Marroquín *et al.*, 1993), meristemos en proliferación (Dhed'a *et al.*, 1991), flores masculinas inmaduras (Ma, 1991; Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 1996; Côte *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 2000, Gómez *et al.*, 2000, Khalil *et al.*, 2002) y flores femeninas inmaduras (Grapin *et al.*, 1998).

Para el cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa AAA*), la mayoría de los grupos de investigación

obtienen suspensiones celulares embriogénicas (SCEs) a partir de callos con estructuras embriogénicas formados mediante el cultivo de agregados florales masculinos en medio de cultivo semisólido (Grapin *et al.*, 1996; Côte *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 2000, Gómez *et al.*, 2000; Georget *et al.*, 2000; Ganapathi *et al.*, 2001; Khalil *et al.*, 2002; Khanna *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2006).

Sin embargo, esta metodología necesita entre cinco y seis meses para la formación del callo con las estructuras embriogénicas y se logra en un bajo porcentaje (3-10%). Además, solo cerca del 30% llega a formar SCEs en un tiempo de dos meses hasta alcanzar su homogeneidad. Estas desventajas han impedido el uso más extendido de las SCEs en el mejoramiento genético y la micropropagación del cultivar 'Grande naine'. En este trabajo se comparan suspensiones celulares embriogénicas establecidas mediante dos métodos: el cultivo de agregados florales masculinos en medio de cultivo semisólido (Côte

*et al.*, 1996) y en medio de cultivo líquido (Chong *et al.*, 2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Establecimiento de suspensiones celulares (Côte *et al.*, 1996)

Como material vegetal se utilizaron agregados florales inmaduros de la inflorescencia masculina (pámpanas) de *Musa* AAA, cv. 'Grande naine'. Las pámpanas se colectaron en el banco de variedades de la Empresa de Cultivos Varios 'La Cuba' ubicada en la provincia Ciego de Ávila, Cuba. Estas se tomaron cuando se habían abierto diez brácteas después de la última flor femenina. Para la formación de callos con estructuras embriogénicas se tomaron 300 agregados florales inmaduros de los rangos del 5 al 15, tomando como 0 el meristemo floral y se procedió según Escalant *et al.* (1994). Después de cinco meses de cultivo en el medio de cultivo M1 (Escalant *et al.*, 1994) en oscuridad total y temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , se evaluó la formación de callos con estructuras embriogénicas por cada rango. A los datos obtenidos se le aplicó un ANOVA *one-way* y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey.

Las estructuras embriogénicas de alta frecuencia formadas fueron inoculadas en el medio de cultivo M2 (Côte *et al.*, 1996) para el establecimiento de SCEs. Se emplearon Erlenmeyers de 25 ml de volumen con 2.0-3.0 ml de medio de cultivo, a los cuales se les inocularon 150-200 mgMF de embriones somáticos y se colocaron en un agitador orbital INFORS (HT), en condiciones de oscuridad constante, velocidad de 90 r.p.m. y temperatura de  $27 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . A los 15 días, las SCEs formadas a partir de los embriones somáticos, fueron tamizadas a través de filtros de malla metálica con un tamaño de poro de 500  $\mu\text{m}$ . Estos filtrados fueron subcultivados a Erlenmeyers de 100 ml con 15 ml de medio de cultivo M2 y 0.45 ml (3%) de volumen de células sedimentadas (VCS). Estas fueron las SCEs que se utilizaron en los diferentes estudios realizados en el trabajo.

### Establecimiento de suspensiones celulares (Chong *et al.*, 2005)

Se inocularon diez agregados florales del mismo rango de diez inflorescencias masculinas diferentes en Erlenmeyers de 50 ml de capacidad con 5.0 ml de medio de cultivo líquido M1. Los Erlenmeyers fueron colocados en un agitador orbital modelo INFORS (HT), en condiciones de oscuridad constante, velocidad de 90 r.p.m. y temperatura de  $27 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . Cada rango representó un tratamiento y por cada uno se evaluaron 10 réplicas. Cada 15 días se renovó la mitad del medio de cultivo hasta la aparición de células en el mismo; a partir de este

momento los cambios de medio de cultivo se realizaron semanalmente. Durante el primer mes de cultivo se evaluó el engrosamiento de los agregados florales. A los 45 días se evaluó la formación o no de estructuras globulares amarilla en la superficie de los agregados florales. Después de los 70 días de cultivo se evaluó la calidad de las suspensiones celulares establecidas mediante la determinación de la viabilidad celular y los conteos celulares utilizando una cámara de Neubauer. Estos se realizaron de forma similar en todos los experimentos que así lo requirieron. Para esto se tomó 1.0 ml de suspensión, después de haber homogeneizado por agitación la muestra y se le añadieron 20  $\mu\text{l}$  de diacetato de fluoresceína (FDA) (Widholm, 1972) por cada ml de muestra. Los conteos se efectuaron en cámara de Neubauer 0.1 mm de profundidad, se evaluaron los tipos de células (meristemáticas y vacuoladas), así como la presencia de agregados celulares. Todo esto se realizó auxiliándose de un microscopio óptico Axioskop (Carl Zeiss) con excitación a 450-490 nm y fluorescencia 510-520 nm. Las suspensiones celulares establecidas fueron subcultivadas al medio de cultivo M2 (Côte *et al.*, 1996) y se procedió como se indicó anteriormente para la multiplicación de estas.

Los datos se analizaron mediante un ANOVA *one-way* y la comparación de medias se hizo con la prueba de Dunett's C o Tukey.

### Comparación del crecimiento celular en suspensiones celulares embriogénicas establecidas por ambos métodos

Se tomaron tres suspensiones celulares procedentes del mejor tratamiento de los agregados florales inmaduros inoculados directamente en medio de cultivo líquido y una suspensión obtenida a partir de callos con estructuras embriogénicas. Estas fueron colocadas en Erlenmeyers de 25 ml con 10 ml de medio de cultivo. Cada suspensión contó con tres réplicas. El medio de cultivo y las condiciones de cultivo fueron similares a las descrito para el establecimiento de las SCEs, no siendo renovado el medio de cultivo durante los 21 días que duró el experimento. En todos los casos se inició el cultivo con un 3% de VCS (Stroose *et al.*, 2006).

Para la confección de las curvas de crecimiento celular se procedió de la siguiente forma: cada tres días, durante 21 días se extrajo con la ayuda de pipetas Pasteur todo el contenido de los Erlenmeyers y se colocó en tubos cónicos; se dejó decantar durante cinco minutos y se midió el VCS. También fue observada su vitalidad celular siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Los datos se analizaron mediante un ANOVA *one-way* y la comparación de medias se hizo con la prueba Dunett's C.

### Formación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido

Se tomaron tres líneas celulares procedentes del mejor tratamiento de los agregados florales inmaduros cultivados directamente en medio de cultivo líquido y una línea celular obtenida a partir de callos con estructuras embriogénicas como control.

Se depositaron 200  $\mu$ l al 33% de VCS (aproximadamente 50 mg de masa fresca) sobre la malla de poliéster de 50  $\mu$ m, la que retuvo las células y el papel de filtro absorbió el exceso de medio de cultivo. Cada una de estas mallas representó una repetición y se colocaron cinco mallas por placa de Petri que contenían el medio de formación de embriones M3 propuesto por Côte *et al.* (1996). Se utilizaron diez repeticiones para cada tratamiento. Las placas fueron colocadas en oscuridad total a una temperatura de  $27.0 \pm 2.0$  °C. Se realizaron observaciones a simple vista a partir del decimoquinto día de cultivo para estimar el tiempo 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. El conteo se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico modelo WILD M8 (LEICA).

Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA *one-way* y la comparación de medias se hizo con la prueba de Dunnett's C.

### Maduración y germinación de los embriones somáticos

Los embriones somáticos obtenidos fueron colocados en medio de cultivo de maduración M4 (Kosky *et al.*, 2000). Las condiciones de cultivo fueron similares a las utilizadas en la formación de embriones. Se colocaron cinco mallas de poliéster donde se formaron

los embriones somáticos en cada placa de Petri que contenía el medio de cultivo M4. Los embriones somáticos permanecieron durante 30 días en este medio de cultivo antes de colocarlos en medio de cultivo de germinación. Pasado este tiempo los embriones somáticos fueron transferidos al medio de cultivo M5 (Kosky *et al.*, 2000) para su germinación. Se emplearon frascos de cultivo de vidrio de 250 ml. Por cada frasco se colocaron 20 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 (FFF) de  $50 - 62.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $27 \pm 2.0$  °C. El medio de cultivo fue renovado a los 30 días de cultivo.

Los datos se analizaron mediante un ANOVA *one-way* y la comparación de medias se hizo con la prueba de Dunnett's C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Establecimiento de suspensiones celulares según Côte *et al.* (1996)

En el proceso de embriogénesis somática, todos los explantes (agregados florales masculinos) formaron glóbulos meristemáticos después de cuatro semanas en el medio de cultivo de inducción M1 sin la realización del subcultivo, sin embargo, sólo 20 de estos glóbulos formaron callos con estructuras embriogénicas (6.67%), la cual se observó después de 20 semanas de cultivo. Los agregados florales 8, 9 y 10 formaron la mayor cantidad de callos con estructuras embriogénicas (cinco, cuatro y cuatro respectivamente), con diferencias significativas con los otros rangos estudiados (Tabla 1). Los agregados florales más diferenciados (13-15) y menos diferenciados (5 y 6) no mostraron respuesta embriogénica.

Tabla 1. Porcentaje de callos con estructuras embriogénicas formados a las 24 semanas de cultivo en el cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa sp.* AAA) en medio de cultivo semisólido.

Rango del agregado floral	Callos con estructuras embriogénicas (%)
5	0.00 e
6	0.00 e
7	0.33 d
8	1.66 a
9	1.33 a
10	1.33 a
11	1.00 b
12	0.66 c
13	0.00 e
14	0.00 e
15	0.00 e
ES	$\pm 0.13$

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según una prueba de Tukey.

A partir de embriones somáticos en etapa globular obtenidos de los callos formados de los agregados florales inmaduros en medio de cultivo semisólido; se establecieron SCEs en el cultivar 'Grande naine', utilizando el medio de cultivo M2.

A los 15 días de cultivo de las suspensiones celulares establecidas, se observaron células embriogénicas pequeñas, esféricas, con un contenido citoplasmático denso, gránulos de almidón y algunos agregados embriogénicos. Después de ocho semanas en el medio de cultivo M2 se obtuvieron SCEs, compuestas por agregados celulares embriogénicos que oscilaban entre los 80-300  $\mu\text{m}$ . Solo el 30% de los cultivos iniciados formaron este tipo de suspensiones, el resto formó suspensiones de células aisladas gigantes, las cuales perdieron la viabilidad celular a las pocas semanas de formadas.

#### Establecimiento de suspensiones celulares según Chong *et al.* (2005)

Los agregados florales masculinos inmaduros cultivados directamente en medio de cultivo líquido respondieron después de dos semanas de cultivo. Primeramente se observó fenolización en la zona de corte y posteriormente un engrosamiento de los explantes. La mayor respuesta de los agregados florales se obtuvo en los rangos del 8 al 15, donde no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 3). La respuesta de los agregados florales masculinos de los rangos 5 y 6 fue baja (10%), el resto de ellos presentó necrosis del tejido. Después de cinco semanas se aparecieron estructuras globulares amarillas en la superficie de los explantes, las cuales se separaron de estos rápidamente. Se hallaron diferencias estadísticas significativas para la variable número de explantes que formaron este tipo de estructuras en los diferentes rangos

estudiados (Tabla 2). Los agregados florales de rangos entre el 7 y el 11 presentaron la mayor cantidad de explantes con formación de estructuras globulares (70-90 %), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos, los agregados florales más desarrollados (12-15) continuaron con un crecimiento desorganizado, pero formaron muy pocas de estas estructuras. En el caso de los más jóvenes, la presencia de las estructuras globulares fue casi nula, debido a la necrosis sufrida en los primeros días de cultivo.

Después de 10 semanas de cultivo se constató turbidez en el fondo de todos los Erlenmeyers. Cuando se observaron las muestras al microscopio se pudo apreciar la presencia de células embriogénicas pequeñas, esféricas, con un contenido citoplasmático denso, gránulos de almidón y agregados embriogénicos conformados por este tipo de células; también se observaron células gigantes.

Al realizar el conteo de los agregados celulares, las células aisladas y las células vacuoladas se obtuvo como resultado que el rango ocho fue el que mayor cantidad de agregados celulares ( $29.84 \times 10^4$ ) y menor cantidad de células gigantes ( $13.65 \times 10^4$ ) y células aisladas ( $88.82 \times 10^4$ ) formó, con diferencias estadísticas significativas con respecto al resto de los tratamientos (Tabla 3). Los agregados florales masculinos menos diferenciados (5 y 6) emitieron al medio en general muy pocas células y los más diferenciados (11-15) emitieron una gran cantidad de células aisladas y células gigantes, esta última característica es indeseable para las suspensiones celulares embriogénicas. Estos resultados pudieran deberse a que los agregados florales del 11-15 tenían células con mayor 'distancia' epigenética del estado embriogénico que los fascículos nodales menos diferenciados (Merkle *et al.*, 1995).

Tabla 2. Respuesta de agregados florales masculinos (AFM) de 'Grande naine' durante las primeras cinco semanas de cultivo.

Rango AFM	Explantes con engrosamiento (%)	Explantes con glóbulos (%)
5	10.00 c	0.00 b
6	10.00 c	7.50 b
7	80.00 b	72.50 a
8	90.00 ab	90.00 a
9	90.00 ab	90.00 a
10	100.00 a	70.00 a
11	100.00 a	87.75 a
12	100.00 a	17.50 b
13	100.00 a	2.50 b
14	100.00 a	2.50 b
15	100.00 a	2.50 b
ES	$\pm 5.21$	$\pm 4.20$

Medias con letras distintas en una misma columna difieren para  $p < 0.05$  según la prueba de Tukey.

Tabla 3. Composición de las suspensiones celulares establecidas mediante la inoculación de agregados florales masculinos en medio de cultivo líquido según el rango de este.

Rango AFM	No. Células aisladas x 10 <sup>4</sup>	No. Agregados celulares x10 <sup>4</sup>	No. Células gigantes x10 <sup>4</sup>
5	15.74 i	0.70 g	52.81 f
6	21.85 h	0.60 g	45.15 g
7	86.22 e	23.56 b	24.85 i
8	88.88 e	29.84 a	13.65 j
9	120.50 c	17.35 c	21.12 h
10	152.28 b	18.25 c	54.45 f
11	182.29 a	12.95 d	73.51 e
12	149.40 b	12.10 d	113.11 d
13	110.28 d	5.45 e	171.50 c
14	66.00 f	4.95 e	245.21 b
15	55.80 g	3.19 f	264.12 a
ES	± 53.71	± 10.26	± 79.98

Medias con letras distintas en una misma columna difieren para  $p < 0.05$  según la prueba de Dunett's C.

Tabla 4. Volúmenes de células sedimentadas (ml) a partir del tercer día de cultivo en la multiplicación de suspensiones celulares en el cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*). 1-3, suspensiones celulares establecidas por el nuevo método, 4, suspensión celular establecida a partir de callos con estructuras embriogénicas.

Suspensión celular	Días						
	3	6	9	12	15	18	21
1	0.32	0.35a	0.39a	0.49ab	0.63a	0.61a	0.60a
2	0.31	0.32b	0.35b	0.46b	0.56b	0.56b	0.55b
3	0.32	0.36a	0.41a	0.52a	0.66a	0.67a	0.66a
4	0.32	0.35a	0.40a	0.51a	0.64a	0.65a	0.64a

Medias con letras distintas por columnas difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba Dunett's C.

A partir de estos resultados se tomaron suspensiones celulares establecidas de agregados florales masculinos inmaduros del rango 8. Después de 20 semanas de iniciado el cultivo y con subcultivos cada 13 días, las suspensiones celulares alcanzaron un alto grado de homogeneidad, donde predominaban los agregados celulares embriogénicos caracterizados por células embriogénicas pequeñas, esféricas, con un contenido citoplasmático denso, vacuolas pequeñas, gránulos de almidón y una alta relación núcleo/citoplasma. El 80% de los cultivos iniciados formó este tipo de suspensiones.

Con la observación periódica en el microscopio óptico de las suspensiones celulares se comprobó que tuvieron cambios en su composición, con un 90-95% de agregados celulares, disminuyó la cantidad de células aisladas y gigantes prácticamente a valores ínfimos a medida que se fueron realizando los subcultivos. Los tamaños de los agregados embriogénicos variaron entre 80-300  $\mu\text{m}$ .

#### Comparación del crecimiento celular en suspensiones celulares embriogénicas establecidas por ambos métodos

Como se aprecia en la tabla 4 y figura 1, en general no existieron diferencias significativas entre las suspensiones celulares establecidas a partir de agregados florales cultivados directamente en medio de cultivo líquido y las establecidas a partir de callos con estructuras embriogénicas. Aunque las suspensiones 1, 3 y 4 tuvieron diferencias estadísticas significativas con la dos a partir del sexto día de cultivo, esta última mostró también un crecimiento continuo (Tabla 4 y Fig. 1). Esto podría deberse a la diferencia entre índices mitóticos existente entre las líneas celulares establecidas. En los primeros tres días se observó en todas las suspensiones evaluadas una fase crecimiento lento, durante esta etapa las células se adaptan a las nuevas condiciones nutricionales para posteriormente iniciar e incrementar la velocidad de la división celular durante las fases logarítmica (días 3-9) y exponencial (días 9-15), después de los cuales no hubo multiplicación celular y luego ocurrió una disminución en el VCSs,

debido principalmente a la aparición de células gigantes, las cuales demoran o tienden a no sedimentar.

Las células en todas las suspensiones celulares (líneas celulares) representadas en la figura 1 mostraron elevada vitalidad al comenzar a descender la curva de crecimiento, los valores oscilaron entre 93.5% y 95.7%.

En ninguno de los tratamientos se produjo lisis celular en los días evaluados, solamente se observaron células gigantes debido, según Niubó *et al.* (2000), a la disminución de los nutrientes y sustancias reguladoras del crecimiento en el medio de cultivo, particularmente el 2,4-D, la ausencia del cual causa agrandamiento de las células y vacuolación.

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, 1999). En la fase de desaceleración progresiva el alto número de células determina que se acumulen los desechos del metabolismo celular, el pH se modifique, la transferencia de energía disminuya y

las células se obstaculicen mutuamente, la velocidad de división disminuye gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria que puede coincidir con el momento que se hayan agotado los nutrientes, o al menos algunos de ellos.

#### Formación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido

Los primeros embriones somáticos se observaron después de 20 días de haber iniciado el cultivo de los agregados embriogénicos en el medio de cultivo M3. Transcurridos 45 días se realizó la cuantificación de los embriones somáticos formados. Como se observa en la figura 2, existieron diferencias estadísticas significativas solo con la línea celular 2, la cual formó un promedio de 517.0 embriones somáticos por cada 200  $\mu$ l al 33% de VCS cultivado. Las tres líneas celulares restantes formaron entre 660.8 y 761.0 embriones somáticos, no hubo diferencias significativas entre las suspensiones celulares establecidas por ambos métodos, respecto a la variable evaluada. La diferencia encontrada con la línea celular 2, puede estar dada por los diferentes potenciales embriogénicos de las líneas celulares.

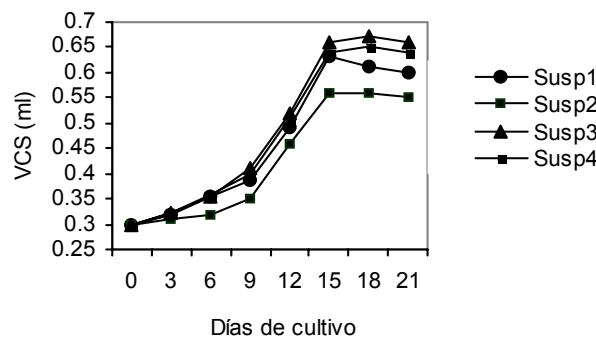
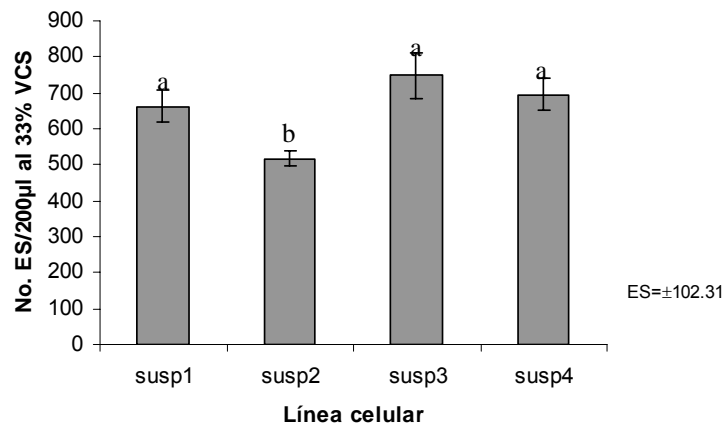


Figura 1. Crecimiento celular en la multiplicación de las suspensiones celulares en el cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*). 1-3 suspensiones celulares establecidas a partir del cultivo de agregados florales masculinos en medio líquido, 4 suspensión celular establecida a partir de callos con estructuras embriogénicas.



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

Figura 2: Embriones somáticos formados a los 45 días de cultivo a partir de las diferentes líneas celulares del cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*). 1-3 suspensiones celulares establecidas a partir del cultivo de agregados florales masculinos en medio líquido, 4 suspensión celular establecida a partir de callos con estructuras embriogénicas.



Tabla 5. Comparación de dos métodos para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de banano 'Grande naine' (*Musa* AAA) a partir de agregados florales inmaduros.

Método	Tiempo de formación de callos	% de callos con estructuras embriogénicas	Tiempo de establecimiento de suspensiones	% de establecimiento de suspensiones	Tiempo total hasta la germinación
Convencional (Côte <i>et al.</i> , 1996)	6 meses	5.39	2 meses	30	11.5 meses
Chong <i>et al.</i> (2005)	-	-	5 meses	80	8.5 meses

## REFERENCIAS

- Becker DK, Dugdale B, Smith MK, Harding RM, Dale JL (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. 'Grande naine' via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep* 19: 229–234
- Chong B, Gómez R, Reyes M, Bermúdez I, Gallardo J, Freire M, Posada L, Herrera I, Swennen R (2005) Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de 'Grande naine' (AAA). *INFOMUSA* 14 (1): 13-17
- Chung JP, Chang TS, Chi AYM, Shii ST (2006) Triploid banana cell growth phases and the correlation of medium pH changes with somatic embryogenesis in embryogenic cell suspension culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 87:305–314
- Cote F, Domergue R, Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C, Escalant JV (1996) Embryogenic cell suspensions from male flower of *Musa* AAA cv. 'Grand Naine'. *Physiol Plant* 97:285-290
- Cronaver S, Krikorian AD (1988) Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seed diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Reports* 7:23-25
- Dhed'a D, Dumortier F, Panis B, Vuylsteke D, De Langhe E (1991) Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana 'Bluggoe' cultivar (*Musa* spp. ABB). *Fruits* 46:125–135
- Escalant JV, Teisson C (1989) Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports* 7:665-668
- Escalant JV, Teisson C, Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell Dev. Biol Plant* 30:181-186
- Ganapathi TR, Higgs NS, Balint-Kurti PJ, Van Eck J (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Rep.* 20: 157–162
- Georget F, Domergue R, Ferrière N, Côte FX (2000) Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA cv. 'Grande naine') embryogenic cell suspension. *Plant Cell Rep* 19:748–754
- Grapin A, Ortíz JL, Domergue R, Babeau J, Monmarson S, Escalant JV, Teisson C, Côte F (1998) Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flower of *Musa* spp. *INFOMUSA* 7(1):13-15
- Grapin A, Schwendiman J, Teisson C (1996) Somatic embryogenesis in banana plant. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 32:66-71
- Khalil SM, Cheah KT, Perez EA, Gaskill DA, Hu JS (2002) Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 20:1128–1134
- Khanna K, Becker D, Kleidon J, Dale J (2004) Centrifugation Assisted *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation (CAAT) of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady finger AAB). *Molecular Breeding* 14: 239–252
- Kosky RG, Gilliard T, Barranco LA, 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
- Ma SS (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops. National Taiwan University, June pp. 181-188. Taipei, Taiwan
- Marroquín CG, Padoscheck C, Escalant JV, Teisson C (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro Plant Cell and Dev Biol.* 29: 43-46
- Merkle S, Parrott W, Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (Ed.) *In Vitro Embryogenesis in plants*, pp. 155-203. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Navarro C, Escobedo RM, Mayo A (1997) *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 51:17–25
- Niubó E, Maribona R, Sánchez C (2000) Caracterización morfológica de una línea celular de caña de azúcar. *Revista GENIC Ciencias Biológicas* 31(3):173-176
- Schoofs H, Panis B, Strosse H, Mayo A, López J, Roux N, Dolezel J, Swennen R (1999) Cuellos de botella en la regeneración y mantenimiento de las suspensiones celulares morfológicas de bananos y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellos. *Infomusa* 8 (2): 3-7
- Widholm J (1972) The use of fluoreSCESin diacetate and phenosafranine for determining viability of culture plant cells. *Stain Technology* 47:189-194