

Obtención de Multimeristemas y Callos de Diferentes Variedades de Banano y Plátano (*Musa* spp.) a partir de “Meristemas Apicales” y “Scalps”

Ortega, N^(1,2); Korneva, S; Ruiz, O; Santos, E; Peralta, E⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral
Campus Gustavo Galindo, Km. 30 ½ Vía Perimetral
Apartado 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador
nortega@espol.edu.ec^(1,2); skorneva@espol.edu.ec⁽¹⁾

⁽²⁾ Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral
Campus Gustavo Galindo, Km. 30 ½ Vía Perimetral
Apartado 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

Resumen

Esta investigación tiene como objetivo la obtención de callos embriogénicos de vitroplantas de Musa spp.: Orito (genotipo AA), Barraganete (AAB), Dominicó (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA), en diferentes medios de cultivos (sólido y líquido) utilizando meristemas apicales y “scalps”. Las variedades triploides y Calcutta – 4 mostraron adecuada multiplicación in vitro en medio de cultivo con hormonas (BN) y sin hormonas (ITC – K). El medio de cultivo H1 líquido estimuló la formación de meristemas apicales de vitroplantas en callos embriogénicos, a corto plazo, condición necesaria para obtención de suspensiones celulares embriogénicas para su uso en transformación genética o propagación masiva. Mientras que los “scalps” de las variedades Barraganete y Williams se desarrollaron mejor en medio de cultivo TDZ, las demás variedades se desarrollaron mejor en medio de cultivo P4. Para la obtención de callos, el método de “scalps” fue más largo que el método de meristemas apicales en medio de cultivo líquido.

Palabra Claves: Meristemo apical, scalps, callos embriogénicos, *Musa* spp.

Abstract

This research is focus in the development of embryogenic calluses from in vitro plants of Musa spp.: Orito (genotype AA), Barraganete (AAB), Dominicó (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) and Calcutta – 4 (AA), in different culture media (solid and liquid) using apical meristem and scalps. The triploid varieties and Calcutta - 4 showed suitable in vitro multiplication in the culture media with hormones (BN) and without hormones (ITC – K). The culture medium H1 liquid stimulated the formation of apical meristems from plantlets in embryogenic calluses in short time, indispensable for the development of cell suspensions suitable for genetic transformation and mass propagation. While the scalps of the varieties Williams and Barraganete grew better on TDZ medium, the other varieties developed better in medium P4. For the development of calluses, the scalps method was longer than the apical meristem method in liquid medium.

Keywords: Apical meristem, scalps, embryogenic callus, *Musa* spp.

1. Introducción

Los cambios climáticos severos experimentados en las últimas décadas y los ataques de numerosas plagas y enfermedades, incluyendo la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morellet), han afectado los rendimientos de banano y plátano en el Ecuador. El uso de pesticidas químicos para contrarrestar sus efectos, conducen a disminuir la rentabilidad de la producción y elevan la contaminación ambiental con riesgos sobre la biodiversidad y la salud humana.

La mejor solución al problema sería obtener nuevas variedades resistentes a la Sigatoka Negra mediante la transformación genética, para mejorar o introducir nuevas características. Los programas de ingeniería genética necesitan cultivos de suspensiones celulares embriogénicas de alta conversión en plantas como material idóneo para estos propósitos [1].

El objetivo de este estudio ha sido obtener callos embriogénicos de diferentes variedades de banano y plátano (*Musa* spp.): Orito (AA), Barraganete (AAB), Dominico (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA) a partir de vitroplantas y comparar la eficacia de dos métodos: a partir de meristemo apical y de “scalps”. Este trabajo está orientado a confirmar si existen diferencias entre los dos métodos en cuanto al desarrollo y obtención de callos de condiciones necesarias y recomendar el mejor de ellos para futuros trabajos de investigación.

2. Generalidades

2.1 Características generales de los cultivos de banano y plátano (*Musa* spp.)

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) pertenecen a la familia *Musaceae* que ha sido dividida en cuatro secciones. La sección *Eumusa* es la de mayor distribución geográfica e importancia por contener las especies *Musa acuminata* y *M. balbisiana* que constituyen los progenitores principales de los cultivares de musáceas comestibles. *M. acuminata* es una especie diploide AA, con fertilidad femenina y masculina que produce frutos con muchas semillas. Por su parte, *M. balbisiana* también es un diploide de constitución genómica BB, con fertilidad femenina y masculina, frutos con muchas semillas y más estable, desde el punto de vista genético que *M. acuminata*.

Estas especies han originado por mutaciones o hibridaciones, los cultivares que hoy en día se siembran alrededor del mundo, pertenecientes a los grupos AA, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB, ABBB.

La triploidía fue otro paso importante en la evolución de las musáceas comestibles; se encuentran en los grupos genómicos AAA, AAB y ABB, son plantas más grandes y más fuertes que los diploides, con frutos de mayor tamaño. Los diploides se distinguen por sus pseudotallos más esbeltos y hojas más erectas [2].

2.1.1 Origen.

El banano y plátano tienen su origen en Asia meridional, conocidos en el Mediterráneo desde el año 650 d.C. La especie llegó a Canarias en el siglo XV y desde allí fue llevado a América en el año 1516. El cultivo comercial se inicia en Canarias a finales del siglo XIX y principios del siglo XX [3] (Figura 1).



Figura 1. Origen y distribución de los plátanos y bananos

2.1.2 Distribución en el Ecuador

2.1.3 Distribución

En nuestro país el cultivo de banano se halla distribuido en todo el Litoral Ecuatoriano. El Ex - Programa Nacional del Banano distribuyó las áreas bananeras de la siguiente forma:

Zona Norte.- ubicada en la provincia de Esmeraldas y Pichincha, abarca las zonas bananeras de Quinindé, Esmeraldas y Santo Domingo de los Colorados.

Zona Central.- abarca las áreas bananeras de Quevedo, provincia de los Ríos; La Maná, provincia del Cotopaxi y Velasco Ibarra en la provincia del Guayas.

Zona Subcentral.- localizada en la provincia de Los Ríos, comprende las áreas localizadas en Pueblo Viejo, Urdaneta, Ventanas y el Cantón Balzar en la provincia del Guayas.

Zona Oriental - Milagro.- se extiende desde Naranjito, Milagro hasta Yaguachi en la provincia del Guayas.

Zona Oriental - El Triunfo.- situada en la provincia del Guayas con incumbencia en el Cantón El Triunfo, La Troncal en la provincia del Cañar y Santa Ana en la provincia del Azuay.

Zona Naranjal.- ocupa las localidades de Naranjal, Balao y Tenguel.

Zona Sur - Machala.- ubicada en la provincia de El Oro, comprende los Cantones: Santa Rosa, Arenillas, Guabo, Machala y Pasaje [4].

2.1.4 Importancia económica.

Los bananos y plátanos son consumidos extensivamente tanto en los trópicos como en países de clima no tropical, apreciados por su sabor, gran valor nutritivo y por su disponibilidad durante todo el año.

A nivel de país el banano se ha incrementado a más de 220.000 has, generando nuevas tasas de empleos para el agricultor ecuatoriano [5].

Según reportes de la Asociación de Exportadores de Bananos del Ecuador (AEBE) a la semana 30 del año 2009, el país exportó 158'935.783 cajas, a un promedio semanal de 5'978,590 cajas (Figura 2).

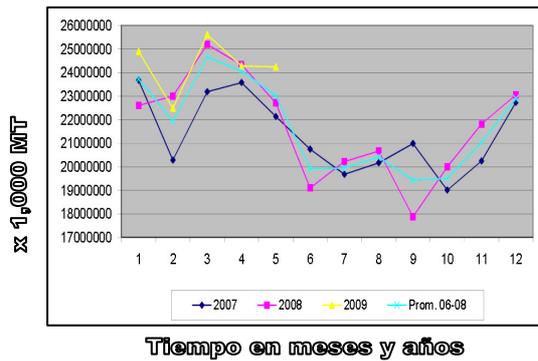


Figura 2. Exportaciones de banano y plátano ecuatoriano

2.1.5 Morfología y fisiología del banano y plátano (*Musa spp.*).

Musa spp. es una planta herbácea, monocotiledónea de la cuál surgen varios individuos conocidos como madre, hija y nieta.

Raíz.- superficial, distribuida radialmente en los primeros 30 cm. del suelo y alcanza un largo de 1,5 a 2 metros.

Rizoma, cormo o cepa.- es una yema vegetativa que sale de la planta madre, sufre un cambio anatómico y morfológico de los tejidos y al crecer diametralmente forma el rizoma. Es utilizado como semilla vegetativa.

Hojas.- poseen diferentes formas y sirven para estimar las etapas morfológicas y fenológicas del cultivo.

Tallo falso o pseudotallo.- soporta a toda la parte aérea de la planta.

Inflorescencia.- racimo (fruto partenocárpico), posee flores hermafroditas y femeninas, en algunos clones las flores masculinas caen.

Fruto.- se desarrolla de los ovarios de las flores pistiladas por el aumento del volumen de las tres celdas del ovario, opuestas al eje central [6] (Figura 3).

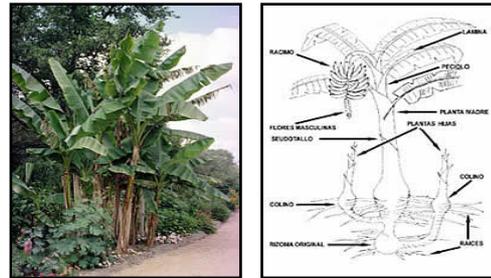


Figura 3. Morfología del banano y plátano.

2.1.6 Plagas y enfermedades mas comunes en banano y plátano (*Musa spp.*)

Picudo Negro (*Cosmopolitas sordidus*, Germ.): plaga del suelo sus larvas se alimentan del cormo, donde forman galerías, originan reducción del peso y calidad de la fruta.

Nematodos (*Radopholus similis*): destruyen el sistema radical de las plantas, lo cual refleja un raquitismo general y menor peso de los racimos. Propician la pudrición del cormo y el volcamiento de las plantas con racimo en desarrollo.

Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morellet): enfermedad foliar más importante del banano y plátano a nivel mundial, ocasiona pérdidas en la producción hasta un 50% e incremento en los costos de producción debido al control basado en agroquímicos (Figura 4).



Figura 4. Daño en hoja ocasionada por Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morellet).

2.2 La biotecnología.

Conjunto de técnicas donde se utilizan los organismos vivos, o partes de estos, para mejorar

procesos y obtener o modificar productos con valor agregado para el uso del hombre. Con el tiempo, las definiciones de biotecnología se han modificado, de acuerdo con el conocimiento que el hombre adquiere sobre los seres vivos. (PROEXPORT, 2009).

2.2.1 Antecedentes.

La biotecnología tradicional comienza cuando el hombre antiguo utilizó bacterias y levaduras para producir cerveza, vino, queso o yogurt.

La biotecnología clásica nace con el desarrollo y la aplicación del cultivo de tejidos vegetales *in vitro.*, aprovechando los conocimientos a cerca de los organismos vivos involucrados en los procesos biológicos y de los mecanismos para controlarlos.

Con la biotecnología moderna se desarrollan las herramientas que permiten el surgimiento de los organismos genéticamente modificados.

2.3 Técnicas de Cultivo de Tejidos

2.3.1 Cultivo de Meristemos Apicales.

Es el ápice de la planta que posee capacidad de rápido crecimiento longitudinal, debido a su totipotencia celular y que sembrado en el medio de cultivo determinado puede originar una planta completa.

2.3.2 Cultivo de “Scalps” o Multimeristemos.

Son pequeños ápices blanquecinos que se obtienen mediante resiembra sucesivas de domos meristemáticos de vitroplantas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) modificado bajo condiciones de oscuridad. Según la variedad difieren en forma y tamaño.

2.3.3 Cultivo de callos.

Los callos son masas de tejido indiferenciado obtenidos mediante la siembra de un explante vegetal en medio de cultivo específico, inducido por un balance hormonal entre auxinas, citoquininas y en especial 2,4 - D.

2.3.4 Cultivo de suspensiones celulares.

Se establecen en el medio líquido, mediante la desagregación de los callos establecidos previamente de distintos órganos de las plantas.

2.3.5 Cultivo de embrioides.

Los embrioides son estructuras primarias con eje radical – apical, no poseen la conexión con el tejido

materno y son obtenidos mediante la siembra de células embriogénicas de las suspensiones celulares en medio de cultivo sin hormonas (Figura 5).

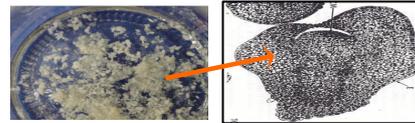


Figura 5. Cultivo de embrioides de banano.

2.4 Aplicación del Cultivo de Tejidos

2.4.1 Obtención de plantas libres de enfermedades sistémicas

Por lo general se realizan los siguientes procesos descritos a los meristemos apicales, debido a que la velocidad de multiplicación de las células meristemáticas es mayor que la velocidad de traslocación de los virus, dejando a la planta libre de ciertas enfermedades sistémicas.

Termoterapia: es la técnica del tratamiento de plantas o tejidos mediante calor, la cual varía de acuerdo a las especies y enfermedades a tratar.

Quimioterapia: las plantas se siembran directamente en el medio de cultivo en presencia de antibióticos u otros componentes, los cuales no permiten multiplicación de los microorganismos en el tejido vegetal.

Electroterapia: es una técnica donde se utiliza la aplicación de corriente eléctrica a yemas por un período variable de tiempo para obtener plantas libres de patógenos.

2.4.2 Multiplicación acelerada *in vitro* de cultivos de importancia económica.

La técnica de cultivo de tejidos permite obtener grandes cantidades de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria en corto período de tiempo y en área pequeña en cualquier temporada del año. Se realiza por dos vías:

Organogénesis: formación de órganos (tallos, hojas, flores, etc.) hasta la regeneración de una planta completa.

Embriogénesis somática: capacidad de las células embriogénicas de formar estructuras parecidas a embriones sexuales capaces de regenerar una planta completa [7]. Esta vía es de gran utilidad para obtener varios clones de banano comerciales, especialmente para las variedades estériles.

2.4.3 Mejora genética de cultivos.

En la biotecnología moderna se puede obtener nuevas variedades mediante la transformación genética donde se utilizan las células embriogénicas en suspensión para obtener una planta completa transformada, o insertando los genes específicos directamente a una sección de la planta mediante los métodos de biobalística y *Agrobacterium tumefaciens*.

3. Materiales y métodos.

3.1 Fase 1: Introducción y establecimiento *in vitro* de cultivos de banano y plátano (*Musa* spp.).

Los cormos de *Musa* spp. (Orito, genotipo AA; Barraganete, AAB; Dominico, AAB; Morado, AAA) de plantas visiblemente sanas y robustas fueron recolectados en campo. Se seleccionaron entre 25 - 50 cormos de cada variedad en estudio. Luego de eliminar las raíces y los restos de tierra, fueron lavados con abundante agua corriente.

En el laboratorio, las muestras fueron reducidas a un tamaño aproximado de 5 cm. Para su desinfección estas fueron sumergidas en solución de hipoclorito de sodio al 4% durante 20 min.

Se traspasaron las muestras a frascos con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Se les realizaron más cortes longitudinales y transversales, reduciendo su tamaño hasta 1cm x 1cm y enjuagando las muestras con agua estéril luego de cada corte. Posteriormente se los sembró uno en cada frasco con medio de cultivo. Los domos meristemáticos sembrados fueron seccionados y sembrados en el medio fresco Murashige & Skoog modificado [8] cada mes hasta obtener el número de plantas adecuado para continuar con los demás experimentos.

De las variedades Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA) se utilizaron explantes provenientes de vitroplantas ya establecidas con anterioridad [9].

Fueron evaluadas 35 plantas por variedad en los medios de cultivo ITC – K que contiene ácido indolacético y kinetina; y el medio BN que contiene ácido indolacético, kinetina y bencil aminopurina al tercer y cuarto mes [9]. Para el análisis se realizaron dos tratamientos y 35 observaciones por variedad: medio de cultivo ITC – K y medio de cultivo BN.

El parámetro a evaluar fue el índice de multiplicación (IM) por variedad en tratamientos al tercer y cuarto mes cuando hubo presencia de plantas completas. En el análisis de datos se utilizaron tablas y gráfico generados en Excel 2007, paquetes estadísticos SPSS 12.0 e Infostat 2.0 (versión estudiantil). Para

determinar la diferencia estadística significativa entre variedades ($p \leq 0.05$) se utilizó la prueba de diferencias de proporciones entre variedades y el índice de multiplicación de plantas (N^0 de brotes / N^0 de plantas).

3.2 Fase 2: Obtención de callos.

3.2.1 Obtención “scalps” o multimeristemas.

Los domos meristemáticos (3x3mm) fueron extraídos de las vitroplantas, puestos bajo oscuridad en el medio de cultivo TDZ durante los dos primeros meses y luego en medio de cultivo P4 [7]. La misma cantidad de domos meristemáticos fueron puestos en oscuridad solo en medio de cultivo P4 durante todo el ensayo. El mantenimiento de las muestras se realizó cada seis semanas hasta obtener los multimeristemas en proliferación o “scalps”. Se evaluaron los domos meristemáticos sembrados, el porcentaje de fenolización, y el número aproximado de “scalps” por explante y variedad, en un período de 3-4 meses en los medios de cultivo TDZ y P4.

Los “scalps” obtenidos (4x4mm) fueron evaluados, explantados y sembrados al cuarto mes en medios de cultivo H1, FM1 y ZZ sólidos, en presencia de 2,4-D para la inducción de callos [9]. Se evaluó el desarrollo de callos por en cada medio de cultivo y se estimó el porcentaje de fenolización. Se tomaron fotos de estos explantes bajo estereomicroscopio.

Los callos obtenidos se subcultivaron en tres diferentes medios de cultivo líquido FM1, ZZ y H1 [9] independientemente para su desagregación. Finalmente, se observaron las desagregaciones de los callos bajo el microscopio invertido para revelar la presencia de células embriogénicas y no embriogénicas [9].

Por cada explante (estructuras, scalps y callo) se realizaron seis tratamientos y 25 observaciones por variedad. Los tratamientos fueron los siguientes: T1, TDZ-P4-FM1; T2, TDZ-P4-ZZ; T3, TDZ-P4-H1; T4, P4-FM1; T5, P4-ZZ; y T6 P4-H1.

3.2.2 Obtención de callos a través de meristemas apicales.

Los meristemas apicales fueron extraídos de vitroplantas bajo observación con estereomicroscopio realizando cortes de (1,5 - 2,0mm). Se los sembró en medio de cultivo H1 sólido (25 vitroplantas) y líquido (25 vitroplantas) (1mg L^{-1} 2,4 – D) [10] para la obtención de callos. Los medios líquidos fueron puestos en agitación en zaranda orbital rotatoria a 90 rpm, bajo oscuridad y a temperatura de 26°C.

Los callos obtenidos en medio de cultivo H1 sólido fueron sembrados en medio de cultivo H1 líquido en

agitación para su mayor multiplicación. Se comprobó la embriogenicidad de los callos desagregados en medio de cultivo H1 líquido observando bajo microscopio invertido la presencia de células embriogénicas.

Se realizaron dos tratamientos (H1 sólido y H1 líquido) y 50 observaciones por variedad. Se evaluó el desarrollo de los callos entre 1-5 meses antes de cada resiembra de las diferentes variedades. Se observó el desarrollo de los tejidos y fenolización, en ambos casos se analizó el porcentaje respectivo.

Para el análisis de los datos en la fase 2 de los dos métodos (“scalps” y meristemas apicales) se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS 12.0, Infostat 2.0 (versión estudiantil), y Excel 2007. Para determinar diferencias estadísticas significativas entre las variedades se aplicó la prueba no paramétrica de Kurskall – Wallis con nivel de significancia al 5%.

4. Resultados y discusión.

4.1 Fase 1: Introducción y establecimientos *in vitro* de cultivos de banano y plátano (*Musa* spp.).

De las variedades en estudio introducidas y establecidas *in vitro*, las variedades Morado (AAA) y Barraganete (AAB) son mucho más productivas con promedio mayor a 0.8 de hijo por planta en ambos tratamientos (ITC-K y BN, Figuras 6 y 7). En las demás variedades también hubo producción de hijos pero con promedios inferiores (Figuras 6 y 7). Los resultados obtenidos en investigaciones anteriores en CIBE [4] sobre el promedio de hijuelos para las variedades de los siguientes genotipos tenemos: (AA) 1.81, (AAA) 1.61 y (AAB) 1.55 del promedio de hijos por variedad, son superiores a los promedios obtenidos en el presente estudio.

Las variedades más productivas, Morado y Barraganete utilizadas en el presente trabajo, son triploides AAA y AAB, respectivamente. Por otro lado, variedades como Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA) presentaron promedios de ahijamiento de 0.34 y 0.74, respectivamente, y no presentaron resultados similares que en investigaciones anteriores [7] posiblemente por la senescencia celular ya que son cultivos establecidos y multiplicados constantemente para su mantenimiento. Se determinó en esta investigación que en los medios de cultivo ITC-K y BN, las variedades triploides se reproducen mejor en ambientes controlados y bajo diferentes concentraciones hormonales.

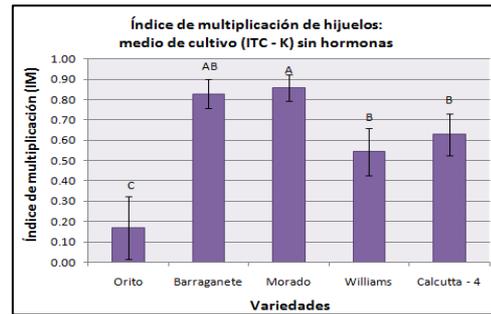


Figura 6. Índice de Multiplicación de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo (ITC - K) sin hormonas. Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia.

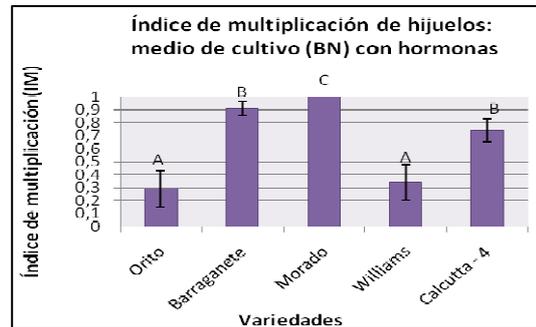


Figura 7. Índice de Multiplicación de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo (BN) con hormonas. Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia.

3.2 Fase 2: Obtención de callos.

3.2.1 Método de “scalps” o multimeristemas.

Los porcentajes de desarrollo de “scalps” fueron variables, inclusive dentro del mismo grupo genómico (Tabla 1). Es decir, las variedades Orito y Calcutta-4, que son los diploides acuminata (AA), poseen 29% y 65% de desarrollo de “scalps”, respectivamente. Asimismo, las variedades Morado y Williams, ambos triploides acuminata (AAA), poseen porcentajes de desarrollo de “scalps” muy diferentes (28% y 100%, respectivamente). Estos resultados indican una dependencia a nivel de variedad más que de genotipo. Trabajos realizados por Korneva et al. (2009) indican un desarrollo promedio de “scalps” de 68% (34 variedades evaluadas) y 66,2% (11 variedades evaluadas) correspondientemente a diploides acuminata (AA) y triploides acuminata (AAA), respectivamente. El desarrollo de “scalps” en la variedad Barraganete (AAB) fue mayor (80%) al promedio obtenido por Korneva et al. (2009) [9] que fue de 52% en 9 variedades evaluadas.

Tabla 1. Porcentaje de explantes de las variedades de banano y plátano (*Musa* spp.) en medios de cultivo TDZ y P4.

Explante (%)		Tratamientos	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta - 4 (AA)
Callos	TDZ	FM1	0	40	12	32	20
		ZZ	16	52	8	20	4
		H1	16	56	20	28	12
	P4	FM1	0	20	8	8	0
		ZZ	16	28	8	12	32
		H1	16	36	0	0	0

El mayor porcentaje de desarrollo de callos a partir de “scalps” fue obtenido en la variedad Barraganete en medios ZZ y H1 provenientes de medio TDZ (52% y 56% respectivamente, Tabla 2). Mientras que en las variedades Orito, Barraganete y Morado el medio FM1 fue detrimento en comparación con los medios ZZ y H1 provenientes del medio TDZ. Para las variedades controles, Williams y Calcutta-4, se obtuvieron mayor porcentaje de desarrollo de callos en medio FM1 en comparación con los medios ZZ y H1. En cambio, los mismos controles, el mayor porcentaje en los tratamientos P4 fue encontrado en el medio de cultivo ZZ (12% y 32% para Williams y Calcutta-4, respectivamente).

El mayor porcentaje de desarrollo de callos a partir de “scalps”, en los tratamientos provenientes del medio TDZ, de acuerdo al genotipo fue de: 56% (AAB), 20% (AA) y 32% (AAA). En el medio P4 el mayor porcentaje para las variedades de genotipo AA fue del 16%, AAB del 36% y AAA del 12%. Las variedades triploides en estudio dieron mejores resultados debido a sus características genéticas y la influencia de diversos medios de cultivo. Las variedades diploides generaron resultados no tan relevantes como las triploides.

Tabla 2. Porcentaje de desarrollo de callos por variedad a partir de “scalps”.

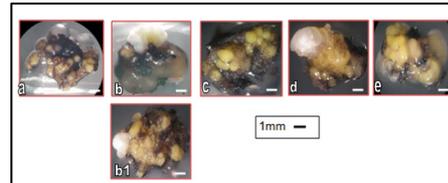
Explantes (%)	Medios de cultivo	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta - 4 (AA)
Subdivisiones de plantas	TDZ	44%	96%	72%	100%	81%
	P4	96%	76%	92%	96%	96%
Scalps	TDZ	29%	80%	28%	100%	65,33%
	P4	56%	40%	52%	96%	88%

Los tratamientos usados para el desarrollo de callos provenientes del medio TDZ pertenecen a los tratamientos T1, T2 y T3.

Todas las variedades presentaron un alto porcentaje de finalización (Tabla 3). Sin embargo, solo se fenolizó la parte inferior de cada “scalps” y se subcultivaba solamente la parte superior que no presentaba fenolización (Figura 8).

Tabla 3. Porcentaje de fenolización por variedad en estudio.

%	Tratamientos	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta - 4 (AA)
Fenolización	T1	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T2	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T3	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T4	100%	100%	100%	86,15%	100%
	T5	100%	100%	100%	86,15%	100%
	T6	100%	100%	100%	86,15%	100%

**Figura 8.** Desarrollo de callos de las variedades en estudio a partir de scalps. Orito (a), Barraganete (b, b1), Morado (c), Williams (d) y Calcutta-4 (e). La barra representa 1 mm.

3.2.2 Método de meristemo apical.

Las variedades Morado (AAA) y Orito (AA) en T2 mostraron completo desarrollo de los meristemos apicales a callos; mientras que para la variedad de Barraganete (AAB) el 66,7% de desarrollo de callos fue obtenido en T1 en un periodo de tiempo reducido 1–2 meses (Tabla 4). Las variedades de genotipos (AA) y (AAA) responden mejor a la inducción de callos en medio de cultivo H1 líquido. Este método es a corto plazo y de mejores resultados, lo que podría contrarrestar las dificultades de establecimiento de futuras suspensiones celulares embriogénicas de banano (Figura 9). En comparación con el método de “scalps”, el método de meristemo apical fue más rápido para la obtención de callo (de 2 a 4 meses). El método de “scalps” demora entre 8 a 12 meses para obtener callo.

Tabla 4. Porcentaje del desarrollo de callos en las variedades de banano y plátano (*Musa* spp.) bajo dos tratamientos.

Variedad	Porcentaje de desarrollo de callos	
	Medio H1 sólido	Medio H1 líquido
Orito	23,3	100,0
Barraganete	66,7	43,3
Dominico	80,0	80,0
Morado	86,7	100,0
Williams	66,7	80,0
Calcutta - 4	56,7	76,7

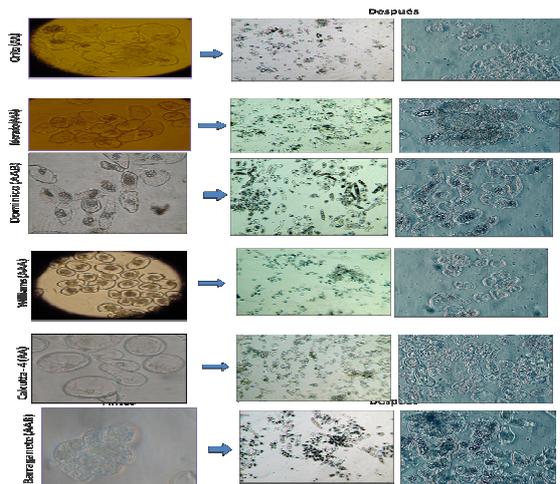


Figura 9. Observación de células embriogénicas de las diferentes variedades de *Musa* spp.

5. Conclusiones y recomendaciones.

5.1 Conclusiones

- Las variedades Morado (AAA) y Barraganete (AAB) por sus características genotípicas presentan buena capacidad de adaptación y reproducción bajo condiciones controladas *in vitro*.
- Las variedades Orito (AA) y Morado presentaron buen desarrollo de “scalps” en medio de cultivo P4, mientras que el Barraganete (AAB) en medio de cultivo TDZ.
- En ambos métodos de “scalps” y meristemo apical, la variedad Barraganete mostró mejores resultados de desarrollo de callos en comparación con las demás variedades.
- El método de meristemo apical en medio de cultivo H1 líquido para obtención de callos embriogénicos es menos laborioso y más efectivo que el método de “scalps”.

5.2 Recomendaciones

- Aumentar las concentraciones de antioxidantes en los medios de cultivo líquidos y sólidos, en obtención de callos y suspensiones celulares, para contrarrestar las fenolicaciones.
- Utilizar el método de meristemo apical en medio de cultivo H1 líquido debido a la rapidez para obtener los callos.

6. Agradecimientos

Este trabajo de investigación se logró gracias al apoyo de la SENACYT a través del proyecto No. PIC

– 08 – 0000300, a los técnicos auxiliares de investigación Sr. Fernando Piña y Sr. Joffre Mendoza, y a los productores del sector de Baba que proporcionaron el material vegetal de inicio para esta investigación. De la misma manera agradezco al personal docente y jefes de área que participan en este proyecto por sus invaluable consejos.

7. Referencias Bibliográficas

- [1] KETCHUM, Elaboración de una planta transgénica: técnica de Biobalística, artículo N°28 del cuaderno del ¿Por que Biotecnología? Disponible en: http://www.porquebiotecnologia.com.ar/.../cuadern_o,2003-2004.
- [2] JONES I., ROBERT D., Banana, Abaca and Ensete diseases and pests: pp. 7 – 9; (1946 – 1999), ABI Publishing
- [3] SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA, INFOAGRO (Artículo disponible en: www.sag.gob.hn/infoagro/.../fichas/Ficha%20tecnica%20platan.pdf, Honduras, 2007).
- [4] NÚÑEZ A. REMIGIO, El Cultivo del Banano Ministerio de Agricultura y Ganadería (Publicación disponible en: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/.../banano.pdf>, 1989).
- [5] VARGAS R. JOSÉ, Antecedentes de banana y/o plátano (Monografía disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos73/antecedentes-banano-platano/antecedentes-banano-platano2.shtml>, 2004).
- [6] STOVER, R. H., SIMMONDS, N. W., et. al., *Musa x Paradisiaca* (Artículo disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Musa_x_paradisiaca, 1987)
- [7] STROSSE, H., DOMERGUE, R., PANIS, B., ESCALANT, J., CÔTE, F., Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano: pp. 5 - 31 Guías Técnicas INIBAP; 2003, Vol. N° VIII (8)
- [8] THORPE, T. A., PATE K. R., KORNEVA S. B.; MARIBONA, R.H.; et. al., Diplomado en Biotecnología. Cultivo de Tejidos (Presentaciones de curso en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL - Peñas): pp. 1 – 8; 1999
- [9] KORNEVA S.; MARIBONA R. H.; et al., Cryopreservation of different biological material obtained from plants of genre MUSA spp. (Memorias del 1ª International Symposium on Cryopreservation in Horticultural species, Leuven, Belgium, 5-8 april, pp.99), 2009.
- [10] DÍAZ E., et al., Morfogénesis de las Suspensiones Celulares de la Caña de Azúcar. Biotecnología Aplicada Vol. 8: pp. 59 – 60; 1991 La Habana, Cuba CIGB