

Biotécnicas aplicadas al mejoramiento genético de *Musa* spp.: embriogénesis somática, transformación genética y estudios de la relación patógeno hospedero

EVA DE GARCÍA¹, MARIBEL RAMÍREZ¹, JEANETVSKA URDANETA¹,
EDITH TERESA VARGAS¹, MIGUEL DE DIEGO¹ Y HÉCTOR FINOL²

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Botánica Tropical

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas - Venezuela. egarcia@reacciun.ve

²Centro de Microscopía Electrónica (CME). Facultad de Ciencias. UCV.

hfinol@electra.ciens.ucv.ve

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, se ha trabajado desde 1990 en el desarrollo de estrategias biotecnológicas para el estudio de diferentes aspectos de la clonación *in vitro* y mejoramiento genético de diferentes clones de *Musa* spp. Estos estudios son de gran importancia para incrementar la producción de plátanos y bananos (*Musa* AA, AAA, AAB y ABB) los cuales tienen un alto valor socioeconómico y nutricional en el país, y cuya explotación genera considerables ingresos y empleos. Sin embargo las enfermedades que atacan a estos cultivos producidas por varios patógenos como virus, bacterias, hongos, algas, además de los daños por nemátodos, obliga a incentivar a los investigadores para realizar estudios de investigación, transferencia de tecnología y control de las mismas. Las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio se han concentrado en la obtención de clones de *Musa* spp. con resistencia al hongo *Mycosphaerella fijiensis* causante de la enfermedad Sigatoka negra que produce una gran merma en la producción de frutos en los cultivos. En el presente trabajo nos referiremos a la producción de embriones somáticos, estructuras de esencial importancia para la transgénesis y presentaremos algunos resultados de análisis de la relación patógeno hospedero (*Mycosphaerella fijiensis*-clones de banano) mediante sistemas *in vitro*.

Introducción

En Venezuela el plátano y el banano (*Musa* spp.) tienen un alto consumo entre la población por su valor nutricional y agradable sabor. Con relación al plátano, en el país se consume anualmente un promedio de 60 kilos de plátanos por persona. De ellos, algo menos de 20 kilos proceden de la producción nacional. Como Venezuela aún no cultiva lo suficiente como para cubrir la demanda doméstica, el resto se importa de Colombia, Ecuador y Costa Rica. En Venezuela, el plátano se cocina de muy diversas formas: se fríe, se asa, se cocina a la parrilla o incluso se cuece. Se trata de un alimento que está presente a diario en la mesa venezolana, a ser posible acompañado del plato nacional, el pabellón criollo.

Con respecto al banano, éste por las características nutricionales de su fruta, se ha mantenido por muchos años como una de las principales frutas de consumo de la población de nuestro país, pero eso no implica que el consumo sea ilimitado, ya que en momentos cuando los precios son demasiados elevados, a pesar que es el banano una fruta preferida, considerada como un producto de postre, puede ser sustituida dentro de la dieta de la población por otro tipo de alimento o fruta.

La producción del banano en Venezuela, ha presentado a partir del año 2003, una considerable

disminución (50%) de la producción, con respecto a 1994, alcanzado el nivel de 492.232 toneladas, lo cual afectó drásticamente el volumen de exportación reportado, observándose que para el año 2005, sólo se logró exportar 8444 toneladas, que representa el 1,5% del total producido; y para el primer semestre del año 2006 se reportaron 6134 toneladas (7).

En la mayoría de los casos la merma en la producción del banano y plátano, se debe al ataque de patógenos. El control de las enfermedades se hace rutinariamente mediante el control químico, que además de costoso es perjudicial para el ambiente. Así las biotécnicas aplicadas al mejoramiento de estos cultivos en nuestro laboratorio, han permitido los siguientes logros: a) La obtención de un somaclon del banano cv. Williams resistente a la Sigatoka negra mediante variación somaclonal inducida por altas concentraciones de sustancia de crecimiento (3); b) El establecimiento de métodos eficientes de mejoramiento genético del plátano cv. Hartón mediante electroporación (2) y biobalística (11); c) La caracterización de algunos genes análogos de resistencia en clones de banano y d) El establecimiento de protocolos adecuados para propagación clonal masiva de los clones mejorados.

En el presente trabajo les presentamos los nuevos resultados obtenidos en los tres últimos años en

relación con investigaciones en clones de banano: embriogénesis somática en cv. Williams, transgénesis mediante biolística en el mismo cultivar y estudios de la relación patógeno-hospedero (*Mycosphaerella fijiensis*- clones de banano) mediante sistemas *in vitro*.

Aspectos en la embriogénesis somática: Características ultraestructurales de callos embriogénicos y no embriogénicos de banano Williams (Musa spp., AAA)

Con la finalidad de aportar nuevos datos que faciliten el conocimiento del proceso embriogénico somático en banano se caracterizan ultraestructuralmente callos embriogénicos y no embriogénicos del banano Williams. Para el estudio se toman pequeñas porciones de ambos callos, embriogénicos y no embriogénicos, formados a partir de flores masculinas inmaduras (1,5-2 cm de largo) durante nueve meses en medio de inducción de callo. Este medio está constituido por el medio Murashige y Skoog (9) suplementado con 1 mg L⁻¹ de ácido indolacético y ácido naftalenacético, 4 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0,2 mg L⁻¹ de biotina, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar. El procesamiento de las muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión (Philips CM-10) se realiza en el Centro de Microscopía Electrónica de la UCV mediante la técnica de corte fino. La misma consiste en: a) Fijación en solución Karnovsky (glutaraldehído al 2,5% y formaldehído al 37%) en buffer fosfato Millonig (BFM) 0,2 M (pH 7,4; osmolaridad 320 mOsm) por 5 días a 4 °C. b) Postfijación en OsO₄ (1%) en BFM por 7 días a 4°C. c) Deshidratación ascendente con etanol al 10, 30, 50, 70, 95 y 100% por 1 hora en cada uno. d) Infiltración en óxido de propileno (100%) por 1 hora, cuatro veces. Luego en óxido propileno y resina (EMbed-812) proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 por 24 horas. e) Inclusión en resina pura por 1 hora, cuatro veces. La última inclusión en resina se deja a 60°C por 10 días para que polimerice. e) Corte de muestras (60 a 90 nm) con cuchilla de diamante en el ultramicrotomo. f) Contrastación de cortes finos en acetato de uranilo (2%) -a 60°C por 30 min. y citrato de plomo. Para el microscopio electrónico de barrido (Hitachi S500), las muestras se procesan hasta etanol absoluto y después se aplica el método de desecación en punto crítico (Hitachi HCP-2), y luego se cubren con oro (Giko Engineering E-IB-2)

Las imágenes electrónicas de transmisión muestran que las células de callo embriogénico presentan algunos componentes de la pared celular y del protoplasto (Fig. 1A-B). De la pared celular se aprecia la pared celular primaria y la laminilla media

(Fig. 1A). El protoplasto rodeado por la pared celular incluye la membrana plasmática y todo lo que ella encierra el protoplasma (Fig. 1A-B).

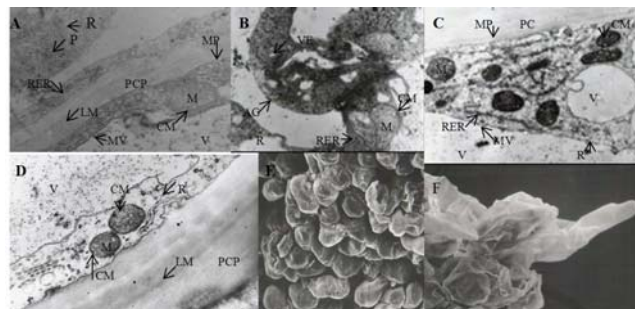


Figura 1. Micrografías electrónicas de transmisión (A-D) y barrido (E-F) de células de callo embriogénico (A, B, E) y no embriogénico (C, D, F) de banano Williams. Componentes observados: Pared celular (PC). PC primaria (PCP). Laminilla media (LM). Membrana plasmática (MP). Mitocondria (M). Cresta mitocondrial (CM). Retículo endoplasmático rugoso (RER). Ribosoma (R). Polisoma (R). Vacuola (V). Membrana vacuolar (MV). Aparato de Golgi (AP). Vesícula (VE). A) 10 000X. B) 51 000X. C) 39 000X. D) 66 000X. E) 450X. F) 200X.

Del citoplasma se visualizan 1) la membrana plasmática ubicada entre la pared celular y el protoplasma (Fig. 1A), 2) sistema de endomembranas que participa en la producción de orgánulos citoplasmáticos entre ellos retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, también incluye la membrana vacuolar, 3) ribosomas libres en el citoplasma, adheridos al retículo endoplasmático rugoso u otros orgánulos, y ribosomas como pequeños grupos de polisomas, 4) mitocondrias como pequeños orgánulos redondos y ovalados con doble membrana con crestas mitocondriales (Fig. 1B). En las células de callo no embriogénico también se detectan los mismos componentes de la pared celular y del protoplasto de las células de callo embriogénico, aunque con pared celular delgada, poco contenido citoplasmático y vacuolas grandes (Fig. 1C-D). Las células embriogénicas muestran citoplasma muy denso, vacuola pequeña y pared gruesa.

En el microscopio electrónico de barrido las células del callo embriogénico se observan pequeñas y redondeadas (Fig. 1E) y las células del callo no embriogénico grandes y alargadas (Fig. 1F). Estos resultados tienen semejanza con otros trabajos (6, 8, 10).

Estudios de la relación patógeno hospedero (Mycosphaerella fijiensis y clones de banano) mediante sistemas in vitro

En las “Memorias IBE 2005” publicamos las observaciones morfológicas en el proceso de infección del hongo *Mycosphaerella* (5) en plantas

de Hartón realizados en sistemas *in vitro*, en esta ocasión usamos la misma metodología expuesta en el 2005 (1), pero se trabaja con clones de banano: Williams (AAA), CIEN BTA-03 (AAAA) y FHIA 18, se analizaron aspectos morfológicos, fisiológicos de la relación patógeno hospedero. Los diferentes aspectos desarrollados fueron:

a-Obtención de cultivos monoascospóricos de *Mycosphaerella fijiensis* (Fig. 2-3); b-Propagación clonal del clon Williams (*Musa* sp. AAA Subgrupo Cavendish, susceptible a la S. negra); su somaclón Cien-BTA-03 (*Musa* AAAA, sub-grupo Cavendish y resistente a la S. negra), y del tetraploide FHIA-18, resistente a la S. Negra. (Fig.4); c-Establecimiento de un sistema de infección, *in vitro* de plantas de *Musa* spp. con inóculos de extracto crudo homogeneizado de *M. fijiensis* y del medio derivado; d-Análisis histológicos de secciones transversales de hojas de plantas tratadas con los diferentes tipos de inóculos, y a diferentes tiempos durante el desarrollo de la enfermedad; e-Análisis de la cantidad de clorofila en las plantas enfermas con respecto a controles sanos y plantas resistentes.

Las conclusiones fueron las siguientes: 1-El sistema *in vitro* utilizado en este estudio, establecido por García *et al.* (4) nos permitió estudiar adecuadamente algunos aspectos morfoanatómicos y fisiológicos de la infección de *Mycosphaerella fijiensis* en Musáceas. 2-El sistema *in vitro* utilizado en este estudio es de gran utilidad para caracterizar cualitativamente el mecanismo de infección controlada en variedades de *Musa* sp. 3-Las observaciones histológicas y fisiológicas sugieren que el efecto fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis* es debido en gran medida a las sustancias químicas de origen fúngico, las cuales tienen una evidente acción en el metabolismo de los tejidos de la planta hospedera. 4-Los análisis morfoanatómicos y fisiológicos corroboran las características de los 3 clones de Musáceas estudiados con relación a su comportamiento ante el ataque de la *Mycosphaerella fijiensis*. Esto es, se verifica la condición susceptible del cultivar Williams, la condición resistente de la variedad FHIA-18 y la condición tolerante del somaclón CIEN-BTA-03.



Figura 2. Ascosporas de *M. fijiensis* germinando sobre agar 4%, vistas al microscopio (100x)



Figura 3. Colonias monoascospóricas de *M. fijiensis* transferidas a medio PDA.



Figura 4. Vitroplanta sembrada en medio MS 0.5 BAP para establecimiento del ensayo de infección

Transformación genética del clon Williams mediante biobalística

En esta investigación se establece un sistema de formación de embriones, obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de flores masculinas inmaduras de banano *Musa* sp. cv. “Williams” (AAA) sub-grupo Cavendish, para su posterior transformación genética por el método de Biobalística (bombardeo de micropartículas). Para lograr este objetivo se desarrolló un protocolo contentivo de los siguientes aspectos: 1-Obtención y multiplicación de callos embriogénicos a partir de flores masculinas inmaduras de *Musa* sp cv. “Williams” en medio sólido. 2-Establecimiento en medio líquido de los callos embriogénicos obtenidos, para la inducción a la formación de embriones somáticos; maduración y regeneración de los embriones somáticos obtenidos. 3-Establecimiento de las condiciones óptimas para el bombardeo de los callos embriogénicos y los embriones somáticos obtenidos. 4-Verificación histoquímica de la inserción del gen de interés en el material vegetal bombardeado.

El método para la inducción a la formación de callo es señalado en las Figuras 5A-D.

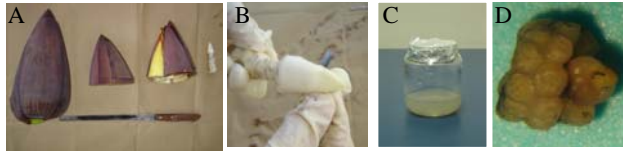


Figura 5. A) Bellota de tamaño ideal para el aislamiento del explante (manitos). B) Aislamiento de las manitos. C) Siembra de las manitos. D) Manos después de 30 días de inoculadas.

En esta investigación se logró la inducción de callo embriogénico en medio con las sales de Murashige y Skoog (MS) (9), suplementadas con vitaminas, aminoácidos, 2-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleno acético (ANA), ácido indolacético (AIA), sacarosa y agar. Estos callos se multiplicaron en las mismas sales con la adición de aminoácidos, vitaminas, extracto de malta, sacarosa y 2,4-D y sacarosa. La formación de los embriones se observó en medio con las sales MS suplementadas con vitaminas, aminoácidos ANA, zeatina (Z), 2 isopentil aminopurina (2ip), cinetina (K), extracto de malta, solidificados con agarosa: La germinación de los mismos se logró en presencia de las mismas sales, vitaminas BAP, sin sustancias de crecimiento, y solidificados con gelrite. (Fig. 6A-D).

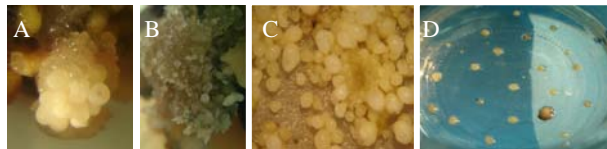


Figura 6. A) Manos de 30 días de inoculadas. B) Callo con embriones. C) Masa de embriones. D) Embriones somáticos.

Los callos embriogénicos y embriones formados fueron bombardeados con micropartículas de tungsteno de 1,1 μ m de diámetro recubiertas con 2 μ g de ADN del plásmido PCAMBIA 320 que confiere resistencia al herbicida glufosinato (11). El bombardeo se realizó con una pistola biológica construida en el IVIC, bajo una presión de He entre 40 y 70 PSI, y un tiempo de inyección de 0,1 segundo. Se evaluó la transformación de los tejidos mediante la expresión transitoria del gen reportero *Gus*, que permite la observación de una coloración azul en los tejidos transformados, producto de la reacción de la β -glucuronidasa con el sustrato, formando un compuesto que puede ser medido por métodos histoquímicos (visualizados mediante un microscopio), fluorométricos y espectrofotométricos.

Agradecimientos

A la Fundación UCV por el financiamiento del Proyecto de Embriogénesis Somática en Banano. A la Histotecnóloga Sofía Mayora, la Lic. Nuri Díaz y el Lic. Ander De Arisqueta por su colaboración en la preparación de las muestras y la obtención de las microfotografías electrónicas de transmisión y barrido.

Referencias

1. De García E., Mejías A., Villarroel C., Valerio R., Vargas, T.E. & Ramírez A. (2005). Estrategias biotecnológicas aplicadas al mejoramiento genético del banano (*Musa*). En: **Memorias del Instituto de Biología Experimental** 4:157-160
2. De García, E. & Villarroel, C. (2007). Transgenic plantain (cv. Hartón) resistant to herbicide BASTA obtained by electroporation. **Acta Horticulturae** 738:509-514.
3. De García, E., Giménez, C., Vidal, M.C., Palacios, G. & Oscar, H. (2001). CIEN BTA-03; A new somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka: Biochemical, genetic and molecular characterization and agronomic studies. **InfoMusa** 10:11-13
4. De García, E., Mejías, A., Vargas, E. & Ramírez, A. (2004). Aspectos morfo-anatómicos y moleculares de la infección *in vitro* de plantas de plátano cv. Hartón (AAB), por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. En: Memorias XVI Reunión ACORBAT. Oaxaca, México. pp. 146-153.
5. Fullerton, R.A. & Olsen, T.L. (1995). Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science** 23:39-48.
6. Lerma, S., Acuña, P., Riveros, A. & Sandoval, J. (2002). Tasa de multiplicación y potencial de regeneración de embriones somáticos de una suspensión celular de banano (*Musa* AAA cv. "Gran enano"). **InfoMusa** 11:38-44
7. Martínez, G., Delgado E., Pargas R., Manzanilla E. & Ramírez H. (2006). Consideraciones generales sobre la producción y el comercio mundial de banano. I: Producción, exportación e importación. **CENIAP HOY**, No 13, 11 pp.
8. Menéndez, A. & de García, E. (1997). Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". **Protoplasma** 199:208-214.
9. Murashige, T. & Skoog, T. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15:473-497.
10. Trujillo, I. & de García, E. (1999). Somatic embryogenesis *in vitro* of *Musa* clones. **Phyton** 64:7-17.
11. Valerio, R. & de García, E. (2007). Optimización de algunos parámetros físicos químicos que afectan la sobrevivencia y expresión transitoria del gen GUS en ápices caulinares *in vitro* de plátano (*Musa* sp. cv. Hartón), transformados mediante biobalística. **Rev. Fac. Agron. (LUZ). Supl. 1**:7-12.