

# Morphoanatomy and ultrastructure studies on embryogenic and non-embryogenic calluses of Williams banana (*Musa* sp.): I. Immature male flowers

Estudios de morfoanatomía y ultraestructura de callos embriogénicos y no embriogénicos de banano Williams (*Musa* sp.): I. Flores masculinas inmaduras

M. Ramírez-Villalobos<sup>1</sup>, E. de García<sup>2</sup>, H. Lindorf<sup>2</sup> and H.J. Finol<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Apartado 15205, ZU4005, Venezuela.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041, Venezuela.

## Abstract

The bananas belonging to the Cavendish subgroup are the most cultivated worldwide, but they have low fertility, slow propagation and long time span from one generation to the next. Application of *in vitro* somatic embryogenesis (SE) has greatly increased *Musa* germplasm handling for the purposes of clonal propagation and improvement of banana cultivars. In the present investigation, the morphoanatomy and ultrastructure of embryogenic and non-embryogenic calluses (EC and NC, respectively) obtained from immature male flowers of Williams's banana plants were examined by means of light microscopy, and by transmission and scanning electron microscopy. Immature male flowers were cultured in callus-induction medium; samples of both kinds of callus were taken at various intervals and processed for later observation. The NC formation from the male flowers was observed after two months of culture, two types of structure were observed; a lax one, showing large elongated hyaline cells, and a watery one with round cells. The NCs presented variability of cell shape, poor and unequal cytoplasmic content, senescent appearance, and intercellular spaces with accumulation of unidentified materials. Primary somatic embryos (which represent an early morphological marker of SE) were detected after four months in the flowers, then, they developed to ECs at next two months. The creamy-

Recibido el 15-6-2011 ● Aceptado el 20-6-2013

Autor de correspondencia e-mail: mcramire@fa.luz.edu.ve.

white ECs with a granular structure showed clearly a cellular organization split into three regions, each with its own distinctive features. The ultrastructural study revealed that the EC cells contained moderate numbers of mitochondria and plastids, and very few drops of lipids. These observations add further important information to the structural studies of SE in bananas, which would help in the understanding of the SE process.

**Key words:** primary somatic embryos, cellular organization, mitochondria, plastids, banana.

## Resumen

Los bananos del subgrupo Cavendish son los más cultivados en el mundo; sin embargo, los bananos tienen baja fertilidad, su propagación es lenta y entre una generación y la próxima ocurre un largo período de tiempo. El uso de la embriogénesis somática (ES) *in vitro* ha incrementado el manejo de germoplasma de *Musa* para los propósitos de propagación clonal y el mejoramiento de los cultivares de banano. En esta investigación se analizaron la morfoanatomía y la ultraestructura de callos embriogénicos (CE) y no embriogénicos (CN) obtenidos de flores masculinas inmaduras de banano Williams, mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido y transmisión. Se cultivaron flores masculinas inmaduras de 1,5 cm de largo en medio de inducción de callo y se tomaron muestras de ambos callos a varios intervalos de tiempo y se procesaron para su observación. Después de dos meses de cultivo las flores formaron CN con dos tipos de estructura: una laxa compuesta de células alargadas hialinas, y otra acuosa con células redondeadas. Los CN presentaron variabilidad en la forma de las células, escaso y desigual contenido citoplasmático, apariencia senescente y espacios intercelulares con acumulación de material no identificado. Hacia el cuarto mes se detectaron embriones somáticos primarios en las flores, que dieron origen al CE en los siguientes dos meses. Estos embriones somáticos primarios representaron un marcador morfológico temprano de la ES del banano Williams. Los CE blanco-crema de estructura granular mostraron una organización celular conformada por tres zonas cada una con características distintivas. Los análisis ultraestructurales revelaron que las células de los CE contuvieron moderado número de mitocondrias y plastidios, y muy pocas gotas de lípidos. Estas observaciones constituyen un aporte importante para los estudios ultraestructurales de la ES en bananos, los cuales podrían ayudar en el entendimiento del proceso de ES.

**Palabras clave:** embriones somáticos primarios, organización celular, mitocondrias, plastidios, banano.

## Introduction

Bananas and plantains constitute an important part of the diet of millions of people in tropical and subtropical

## Introducción

Los bananos y plátanos constituyen una fuente importante en la dieta de millones de personas que habitan

regions, and most of their production is commercialized for fresh consumption. In Venezuela the area used for those crops was 43,223 ha, with an estimated yield of 455,213 t and 10.53 t.ha<sup>-1</sup> in 2011 (Fedeaagro, 2012). The banana plants of the Cavendish subgroup, which includes Williams, are the most widespread and they dominate the world market. The Williams banana is a commercial AAA triploid and it is susceptible to black Sigatoka (*Mycosphaerella fijensis*) and to yellow Sigatoka (*M. musicola*). Both diseases cause great losses in production and quality of the fruits. This has led to search new resistant or tolerant banana clones using modern biotechnology such as gene transfer, somatic embryos techniques which

are an important alternative for *Musa* genetic breeding due to their high potential to produce non-chimeric plants (Houllou *et al.*, 2005).

Most of the commercial bananas and plantains produce sterile seeds, and therefore, the somatic embryogenesis is restricted to the induction of embryogenic cells derived from immature flowers (Arteaga *et al.*, 2002), immature floral hands or shoot tips, while usually they cannot be obtained from the young tissues of cygotic embryos (Strosse *et al.*, 2006). Induction of such processes in somatic cells is possible only by using the right kind of cells, competent, able to respond to induction signals triggered by the growth regulatory molecules, i.e. auxins (Komamine, 2003). This capability to express the embryogenic potential might be epigenetically determined and it may be influenced by the stage of development of the

en regiones tropicales y sub-tropicales, y la mayor parte de sus producciones son comercializadas para el consumo fresco. En Venezuela, el área utilizada para éstas cosechas eran de 43.223 ha, con un rendimiento de 455.213 t y 10.53 t.ha<sup>-1</sup> en 2011 (Fedeaagro, 2012). Las plantas de banano del subgrupo Cavendish, que incluye Williams, son las más distribuidas y dominan el mercado a nivel mundial. El banano Williams es un triploide AAA comercial y susceptible a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis*) y Sigatoka amarilla (*M. musicola*). Ambas enfermedades causan grandes pérdidas en la producción y en la calidad de los frutos. Esto ha llevado a la búsqueda de clones nuevos de banano resistentes o tolerantes, usando la biotecnología moderna como la transferencia de genes, embriones somáticos; técnicas que se consideran como alternativas importantes para el mejoramiento genético en *Musa*, debido a su alto nivel potencial para producir plantas no quiméricas (Houllou *et al.*, 2005).

La mayoría de los bananos y plátanos comerciales, producen semillas estériles, consecuentemente, la embriogénesis somática está limitada a la inducción de células embriogénicas a partir de flores inmaduras (Arteaga *et al.*, 2002), manos florales inmaduras o yemas apicales del vástago. Usualmente, éstas no pueden obtenerse de los tejidos juveniles de los embriones cigóticos (Strosse *et al.*, 2006). La inducción de dicho proceso en las células somáticas es solamente posible a través de células competentes, capaces de responder a la señal inductiva estimulada por las sustancias reguladoras del crecimiento, ejemplo de éstas serían las

plants, and the nature and type of explants, among others (Mikula *et al.*, 2004; Von Arnold *et al.*, 2002).

Indirect somatic embryogenesis represents an important step toward the formation of highly embryogenic calluses, which are the result of cellular proliferation and the subsequent elongation of the cells. The diverse capabilities of embryogenic calluses have been related to the shape and other notorious morphological features within their cells (Fehér *et al.*, 2003; Moghaddam and Taha, 2005). The study of the somatic cells has become important because it had contributed to the knowledge of regulatory routes of cell proliferation and to the understanding of how non-differentiated cells (cells of the callus) can be stimulated toward the differentiation of embryogenic cells (Moghaddam and Taha, 2005).

The conditions of embryogenic and non-embryogenic cells have been correlated with typical morphological changes, enhancing the importance of morphoanatomical and ultrastructural studies of these kinds of cells (Fehér *et al.*, 2003). In the case of bananas the available information about embryogenic and non-embryogenic cells is scarce and incomplete. This knowledge is essential to optimize the somatic embryogenesis process in these species. In view of the economical importance of banana plants in Venezuela and worldwide, the present work was aimed to study morphoanatomical and ultrastructural aspects of embryogenic and non-embryogenic calluses obtained from immature male flowers of Williams banana.

auxinas (Komamine, 2003). Esta capacidad para expresar el potencial embriogénico puede estar determinada epigenéticamente, e influenciada por los estados de desarrollo de las plantas, la naturaleza y tipo de explante, entre otras aspectos (Mikula *et al.*, 2004; Von Arnold *et al.*, 2002).

La embriogénesis somática indirecta representa un paso importante para la formación de grandes callos embriogénicos, el cual es el resultado de la proliferación celular y el subsiguiente alargamiento de las células. Las diferentes capacidades de los callos embriogénicos se han detectado a través de la forma y otras características morfológicamente notorias dentro de las células (Fehér *et al.*, 2003; Moghaddam y Taha, 2005). El estudio de las células somáticas ha sido de gran importancia ya que ha contribuido al conocimiento de las rutas reguladoras de la proliferación celular, y al entendimiento de cómo las células no-diferenciadas (células de los callos) pueden ser estimuladas hacia la diferenciación de células embriogénicas (Moghaddam y Taha, 2005).

Las condiciones de células embriogénicas y no embriogénicas han sido relacionadas con cambios morfológicos típicos, aumentando la importancia de los estudios morfo-anatómicos y ultraestructurales de este tipo de células (Fehér *et al.*, 2003). En el caso del banano, la información disponible acerca de las células embriogénicas y no-embriogénicas es muy escasa e incompleta. Estos estudios son esenciales para optimizar los procesos de embriogénesis somática en estas especies. En vista de la importancia económica de las plantas de

## Materials and methods

**Plant material and procedures.** Male inflorescences of the Williams banana were recollected at the Musaceae Germoplasm Bank of the EXPERTA-Experimental Station, Faculty of Agronomy, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. The male inflorescences were located in the terminal region of the bunch. They were collected when the section of the central axis of the bunch without fruits, located between the fruits and the male inflorescence, had a length from 20 to 30 cm. Several bracts were removed from the inflorescences until their length was reduced to 15 cm; afterwards they were washed twice with water and commercial liquid soap (1 mL.L<sup>-1</sup>, i.a. about 27% sodium phenylsulphonate and 0.08% of Irgasan DP-300). Three more bracts were eliminated and the inflorescences were immersed for 5 min in 20% commercial chlorine (i.a. 0.85% v/v sodium hypochlorite) plus two drops of tween-20 L<sup>-1</sup>, followed by a rinse with sterilized distilled water under aseptic conditions, in a laminar flow chamber. Finally, all the remaining bracts were removed until immature flowers 1.5 cm long were obtained to form the explants, which were kept for 5 min in the antioxidant L-cysteine (100 mg.L<sup>-1</sup>) prior to their planting.

**Induction of embryogenic and non-embryogenic calluses.** The immature flowers were cultured in callus-induction medium (CM), according to Escalant *et al.* (1994), but also containing 0.2 mg biotin and 7 g agar L<sup>-1</sup>. These explants were

banano en Venezuela y a nivel mundial, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar los aspectos morfo-anatómicos y ultraestructurales de callos embriogénicos y no embriogénicos obtenidos a partir de flores masculinas inmaduras del banano Williams.

## Materiales y métodos

**Material de la planta y procedimientos.** Las flores masculinas del banano Williams fueron recolectadas del Banco de Germoplasma de Musáceas de la Estación Experimental Experta, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. Las inflorescencias masculinas se ubicaron en la parte terminal del racimo. Éstas fueron recolectadas cuando la sección del eje central del racimo sin frutos, localizado entre los frutos y la inflorescencia masculina, tenía una longitud de 20 a 30 cm. Se removió un número considerable de brácteas de las inflorescencias hasta que la longitud se redujo a 15 cm; luego, estas fueron lavadas dos veces con jabón líquido comercial (1 mL.L<sup>-1</sup>, i.a. aproximadamente 27% de fenil sulfonato de sodio y 0,08% de Irgasan DP-300).

Se eliminaron tres brácteas más y las inflorescencias fueron sumergidas durante 5 minutos en cloro comercial al 20% (i.a. 0.85% vv hipoclorito de sodio) mas dos gotas de tween-20 L<sup>-1</sup>, seguido de un enjuague con agua esterilizada bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar. Finalmente, el resto de las brácteas fueron removidas hasta obtener flores inmaduras de 1.5 cm de longitud o

incubated in magentas (9.8 cm high and 6.5 cm wide) containing 100 mL of medium, in darkness and at  $26\pm 1^\circ\text{C}$  until develop into callus. Media pH was adjusted to 5.8 prior to sterilization at  $121^\circ\text{C}$  and a pressure of  $1.1\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$  for 20 min. A control was set by immature male flowers cultured in CM without the auxins AIA (indole acetic acid), ANA (naphthylacetic acid) or 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid).

**Morphoanatomy.** The main morphoanatomical features were determined in explants, cultured flowers and calluses. Samples were fixed in 70% FAA (5 mL formaldehyde, 5 mL glacial acetic acid in 90 mL of 70% ethanol) for 15 days, followed by an ascending dehydration series in tert-butyl alcohol, according to Ramírez *et al.* (2008), keeping the samples 30 min in each solution and replacing the paraffin three times in 30 min. Longitudinal slices of the samples were prepared using a Leitz-Wetzlar rotatory microtome and stained with 1% aqueous safranin in distilled water, and 0.5% fast green in absolute ethanol. The slices were then mounted in Canada balsam and examined by light-microscope (Nikon Type 108, Japan). The sections of the flowers grown in CM were processed by hand and then, they were stained with 0.5% aqueous toluidine blue (which resolves tissue sections into their components cell types by coloring various types of wall strikingly different colors) and mounted in a 50:50 water:glycerine mixture.

**Ultrastructure.** Embryogenic and non-embryogenic callus samples were processed for their examination in the transmission electron

explantes, las cuales se mantuvieron durante 5 min en el antioxidante L-cisteína ( $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) antes de ser plantadas.

### **Inducción de callos embriogénicos y no embriogénicos.**

Las flores inmaduras se cultivaron en un medio de inducción calloso (CM), de acuerdo con Escalant *et al.* (1994), que además contenía 0,2 mg de biotina y 7 g de agar  $\text{L}^{-1}$ . Los explantes fueron incubados en magentas (9,8 cm de altura y 6,5 cm de ancho) con 100 mL del medio, en un sitio oscuro a una temperatura de  $26\pm 1^\circ\text{C}$  hasta la formación de callo. El pH del medio se ajustó a 5,8 antes del proceso de esterilización de  $121^\circ\text{C}$  y una presión de  $1,1\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$  durante 20 min. Se estableció un control constituido por flores masculinas inmaduras en CM sin las auxinas AIA (ácido indolacético), ANA (ácido naftalenacético) o 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxyacético).

**Morfoanatomía.** Las principales características morfoanatómicas se determinaron en los explantes, flores cultivadas y callos. Las muestras se fijaron en 70% FAA (5 mL formaldehído, 5 mL ácido acético glacial en 90 mL de 70% de etanol) durante 15 días, seguido por una serie ascendente de deshidratación con alcohol terbutílico, siguiendo la metodología de Ramírez *et al.* (2008), y manteniendo las muestras durante 30 min en cada solución y remplazando la parafina tres veces en 30 min. Los cortes longitudinales de las muestras se prepararon usando un micrótopo rotatorio Leitz-Wetzlar y se colorearon con safranina acuosa al 1% (en agua destilada) y verde rápido 0,5% (en etanol absoluto). Luego, los cortes se



microscope (Philips CM-10 and JEM-1011) following the thin-slice technique used at the Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Central de Venezuela, increasing the exposure time with each step. This technique consists of: a) Fixation in Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde and 37% formaldehyde) in 0.2 M Millonig's phosphate buffer (MPB) (pH 7.4; osmolarity 320 mOsm) for 5 days at 4°C. b) Three rinses in MPB, 20 min each, at 4°C. c) Post-fixation in 1% OsO<sub>4</sub> in MPB for 7 days at 4°C. d) Four washes for 20 min in distilled water at 4°C. e) Dehydration in an ascending alcohol series (10, 30, 50, 70, 95% and absolute alcohol), 1 h each at 4°C, followed by two changes in absolute ethanol at room temperature. f) Infiltration in propylene oxide for 1 h, four times, followed by infiltration in propylene oxide plus resin (EMbed-812) in these proportions 1:1, 1:2 and 1:3 for 24 h each. g) Inclusion in pure resin for 1 h, four times. The samples were then mounted on resin blocks and kept at 60°C for 7 days. h) Slicing of samples (60 to 90 nm thick) with a diamond knife on a Sorvall Mod. Porter Blum NT2B ultramicrotome. i) Thin slice contrasting with 2% uranyl acetate for 30 min (at 60°C), followed by lead citrate for 10 min (at 25°C).

The ultramicrotome was also used to prepare semi-thin slices of 0.5 µm for their observation under the light microscope (Nikon type 108). These slices were stained with filtered Smogyi solution (1% toluidine blue and 1% azur II) and mounted on Entellan. For the scanning electron microscopy (Hitachi S500, Japan) the samples were processed as mentioned above until the

montaron en una solución de bálsamo de Canadá y se examinaron bajo microscopio de luz (Nikon 108, Japón). Las secciones de las flores que crecieron en CM fueron procesadas a mano alzada, se colorearon con azul toluidina acuosa al 0,5% (colorante que permite la obtención de diferentes tonos en los componentes celulares y tisulares. Lo que conlleva la división de los tejidos en sus componentes, mediante la coloración de algunas partes de la pared; y se montaron en una solución 50:50 de agua:glicerina.

**Ultraestructura.** Las muestras de callos embriogénicos y no embriogénicos fueron procesadas para su evaluación en el microscopio electrónico de transmisión (Philips CM-10 and JEM-1011) mediante la técnica de corte fino usada en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Central de Venezuela, aumentando el tiempo de exposición en cada paso. Esta técnica consiste en: a) fijación en una solución Karnovsky (2.5% glutaraldehído y 37% de formaldehído) en 0,2 M de buffer fosfato Millonig's (MPB) (pH 7,4, osmolaridad 320 mOsm) durante 5 días a 4°C. b) tres enjuagues en MPB durante 20 min cada uno a 4°C, c) Post fijación en 1% OsO<sub>4</sub> en MPB por 7 días a 4°C. d) Cuatro lavados durante 20 min en agua destilada a 4°C. e) Deshidratación en serie ascendente de alcohol (10, 30, 50, 70, 95% y alcohol absoluto), 1 h cada una a 4°C, seguido de dos cambios en etanol absoluto a temperatura ambiente. f) Infiltración en óxido propileno por 1 h, cuatro veces, seguido de una infiltración en óxido propileno más resina (EMbed-812) en las siguientes proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 durante 24 h cada

dehydration steps in absolute ethanol, followed by dehydration at the critical point (Hitachi HCP-2, Japan) for 25 min at 40°C and a pressure of 80 to 90 kg.cm<sup>-2</sup>. Lastly, they were covered with gold (Giko Engineering E-IB-2) for 15 min in high vacuum.

**Experimental design and studied variables.** The experimental setup was completely at random, with 20 replicates and four testing units per replicate. During the stage of callus induction the following variables were evaluated (at 1.5, 2, 4, 6 and 9 months): percentages of flowers with primary somatic embryos (PSE), percentages of flowers with embryogenic callus (PEC) and percentages of flowers with non-embryogenic callus (PNC), as well as the number of embryos per cm<sup>2</sup> (E). Additionally, in the cells of both types of callus the following cytoplasmic structures were recorded: endoplasmic reticulum, dictyosomes, ribosomes, polysomes, mitochondria, plastids, lipid drops, lysosomes, myelin figures and bodies with crystals.

## Results and discussion

**Development of embryogenic callus.** After four months of culture 56.6% of the immature male flowers of Williams banana generated primary somatic embryos (PSE) and 100% of the flowers had non-embryogenic calluses (PNC), when callus-induction medium MC1 containing auxins was used (table 1). The primary embryos evolved towards embryogenic callus after six month, time at which 56.6% of the flowers grew embryogenic calluses (PEC) with

una. g) Inclusión en resina pura durante 1 h, cuatro veces. Las muestras se montaron en bloques con resina y se mantuvieron a 60°C durante 7 días. h) Las secciones de las muestras se cortaron (60 a 90 nm de espesor) con hojilla de diamante en un micrótopo modelo Sorvall Porter Blum NT2B. i) Los cortes finos se contrastaron con 2% de acetato uranilo por 30 min (a 60°C), seguido de citrato de plomo por 10 min (a 25°C).

El ultramicrotomo también se utilizó para preparar cortes semi-finos de 0.5 µm para observarlos bajo microscopio de luz (tipo Nikon 108). Estos cortes se sumergieron en una solución filtrada Smogyi (azul toluidina al 1% y azul II al 1%) y se montaron en Entellan. Para la microscopía electrónica de barrido (Hitachi S500, Japón) las muestras se procesaron como mencionado anteriormente hasta el paso de deshidratación con etanol absoluto y después se aplicó el método de desecación en punto crítico (Hitachi HCP-2, Japón) durante 25 min a 40°C y una presión de 80 a 90 kg.cm<sup>-2</sup>. Finalmente, las muestras se cubrieron con oro (Giko Engineering E-IB-2) durante 15 min a vacío grueso.

**Diseño experimental y estudio de las variables.** El diseño experimental fue completamente al azar, con 20 repeticiones y cuatro unidades por repetición. Durante la etapa de inducción de callo se evaluaron las siguientes variables (en 1,5; 2, 4, 6 y 9 meses): porcentajes de flores con embriones somáticos primarios (PSE), porcentajes de flores con callos embriogénicos (PEC) y porcentajes de flores con callos no embriogénicos (PNC), al igual que el número de em-



**Table 1. Percentages of flowers with primary somatic embryos (PSE), flowers with embryogenic calluses (PEC), flowers with non-embryogenic calluses (PNC) and numbers of embryos per cm<sup>2</sup> (E) during the *in vitro* culture of immature male flowers from Williams banana.**

**Cuadro 1. Porcentaje de flores con embriones primarios somáticos (PSE), flores con callos embriogénicos (PEC), flores con callos no embriogénicos (PNC) y número de embriones por cm<sup>2</sup> (E) durante el cultivo *in vitro* de flores masculinas inmaduras del banano Williams.**

Callus-induction medium (CM)	Culture time (months)	PSE(%)	PEC(%)	PNC(%)	E(%)
CM with auxins	1.5	Nd	Nd	56.6	Nd
	2	Nd	Nd	73.3	Nd
	4	56.6	Nd	100	Nd
	6		56.6	100	38
	9		56.6	100	51
CM without auxin*	9	Nd	Nd	Nd	Nd

\* Explants with high oxidizing levels; Nd: not detected.

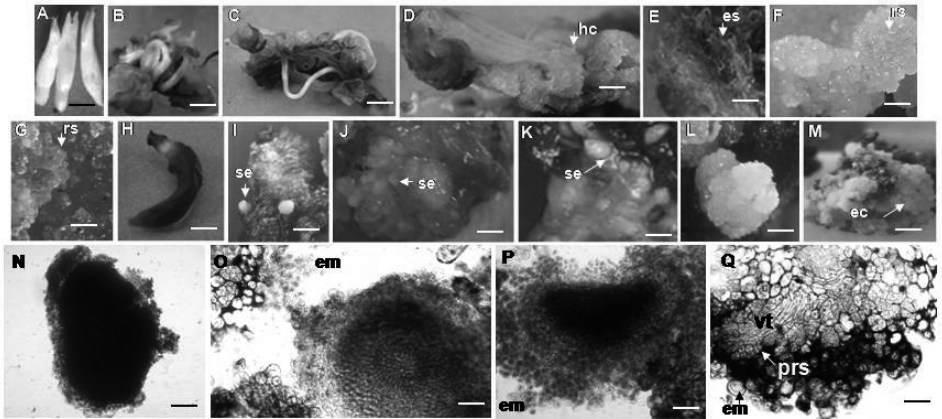
globular somatic embryos on their periphery (figure 1). This percentage remained constant, but the amount of calluses and the number of somatic embryos in them, increased by the ninth month. These PEC resemble those reported for immature male flowers 0.25 to 2 cm long from the Williams clone (Arteaga *et al.*, 2002), although this author did not mention whether or not the calluses originated from primary somatic embryos.

**Morphoanatomy of the explants in callus-induction medium.** After two months of culture in the induction medium, the flowers underwent various morphological changes, among them rolling up (100% of the flowers), increase of the initial size of 1.5 cm to 10.7 cm and slight blackening (by oxidation) over certain

briones por cm<sup>2</sup> (E). Adicionalmente, en las células de ambos tipos de callos, se observaron las siguientes estructuras citoplasmáticas: retículo endoplasmático, dictiosomas, ribosomas, polisomas, mitocondrias, plastidios, gotas de lípido, lisosomas, figuras mielínicas y cuerpos con cristales.

## Resultados y discusión

**Obtención de callos embriogénicos.** Luego de cuatro meses en el cultivo, 56,6% de las flores masculinas inmaduras del banano Williams generaron embriones somáticos primarios (PSE) y 100% de flores tuvieron callos no embriogénicos (PNC) cuando se utilizó medio de inducción de callo MC1 con auxinas (cua-



**Figure 1.** Embryogenic callus of immature male flowers from Williams banana. A) Immature male flowers before culture. B-D) Flowers, at two months of callus-induction with auxines. E-G) Non-embryogenic callus from tepals, at nine months. H) Flowers in medium without auxines. I-L, N) Primary somatic embryos. L) Embryo with formation of callus. M) Embryogenic callus from primary somatic embryo, at nine months. N-Q) Longitudinal slices of globular or elongated primary somatic embryos (N-P) and flowers in callus-induction medium, at four months (Q). ec, embryogenic callus. em, embryogenic cells. es, elongated structures, prs, proembryonic structure. rs, round structure. se, somatic embryo. vt, vascular trace. Bars: A,H,M = 4.5 mm. B,C = 10 mm. D,E = 4 mm. F,J-K = 2.5 mm. G,I = 1 mm. L = 0.75 mm. N = 200  $\mu$ m; O-Q = 80  $\mu$ m.

**Figura 1.** Callos embriogénicos de flores masculinas inmaduras del banano Williams. A) flores masculinas inmaduras. B-D) flores de dos meses con inducción callosa con auxinas. E-G) callos no embriogénicos de tépalos a los nueve meses. H) flores en un medio sin auxinas. I-L N) embriones somáticos. L) embriones con formación callosa. M) callos embriogénicos de embriones somáticos primarios a los nueve meses. N-Q) cortes longitudinales de embriones globulares de embriones primarios somáticos alargados (N-P) y flores en un medio de inducción callosa a los cuatro meses (Q). ec, callos embriogénicos. em, células embriogénicas. es, estructuras alargadas, prs, estructuras pro-embriogénicas. rs, estructuras redondas. se, embriones somáticos. vt, trazo vascular. Barras: A, H, M = 4,5 mm. B,C = 10 mm. D,E = 4 mm. F, J-K = 2,5 mm. G,I = 1 mm. L = 0,75 mm. N = 200  $\mu$ m; O-Q = 80  $\mu$ m.

areas of the tepals (figures 1A-1D), which later on, spread over the entire tepal, without causing any apparent inhibitory effect on the calluses. The formation of non-embryogenic calluses was also seen, mainly at the edges of the tepals (figures 1E-1G) and they tended to become black from the fourth month onwards until they became entirely necrotic. The flowers grown in media without auxins (controls) did not show any morphological changes only the blackening of tissues (figure 1H) which led to death of the explants after some time; this reveals that those compounds are necessary for callus induction. Death of explants had already been observed in other species, especially when lacking auxins (Urbanek *et al.*, 2004).

Towards the fourth month of culture primary somatic embryos were detected on the lower third of the tepals and on the external (figure 1I) and inner (figures 1J-1K) parts of the flowers. These embryos were mainly globular, initially with a smooth brilliant surface (figure 1J-1k) and later became rough due to cellular proliferation (figures 1L, 1N-1P). These embryos did not follow the next embryonic stages, they shifted towards the production and liberation of embryogenic cells which remained on the periphery of the primary embryo (figure 1L) and later embryogenic callus with new embryos were produced (figure 1M). The presence of globular somatic embryos contributes to the formation of embryogenic calluses with a high potential for the formation of further globular embryos in the cultures of Williams banana flowers, this finding had not previously

dro 1). Estos embriones primarios dieron origen al callo embriogénico hacia el sexto mes, tiempo en el que el 56,6% de las flores presentó callo embriogénico (PEC) con embriones somáticos globulares en la periferia (figura 1). Este porcentaje permaneció constante, excepto la cantidad de callos y el número de embriones somáticos en ellos, el cual aumentó en el noveno mes. Estos PEC se asemejan a aquellos reportados en flores masculinas de 0,25 a 2 cm de largo en los clones Williams (Arteaga *et al.*, 2002), sin embargo, este autor no mencionó si los callos se originaron de los embriones somáticos primarios.

**Morfoanatomía de los explantes en medio de inducción de callo.** Luego de 2 meses de cultivo en el medio de inducción de callo, las flores sufrieron varios cambios morfológicos, entre estos enrollamiento (100% de las flores), incremento del tamaño inicial de 1,5 cm a 10,7 cm y ligero ennegrecimiento (producto de la oxidación) en ciertas áreas de los tépalos (figuras 1A-1D), el cual con el tiempo llegó abarcar casi todo el tépalo, sin causar ningún efecto inhibitorio aparente en los callos. De igual forma se observó la formación de callos no embriogénicos, principalmente en los bordes de los pétalos (figuras 1E-1G) que tendió a tornarse oscuras desde el cuarto mes hasta necrosarse por completo. El crecimiento de las flores en el medio sin auxinas (control) no mostró cambios morfológicos, solamente el ennegrecimiento de los tejidos (figura 1H), que produjo con el tiempo la muerte de los explantes; esto confirma que esos componentes son necesarios para la inducción de los callos. La muerte de los explantes había

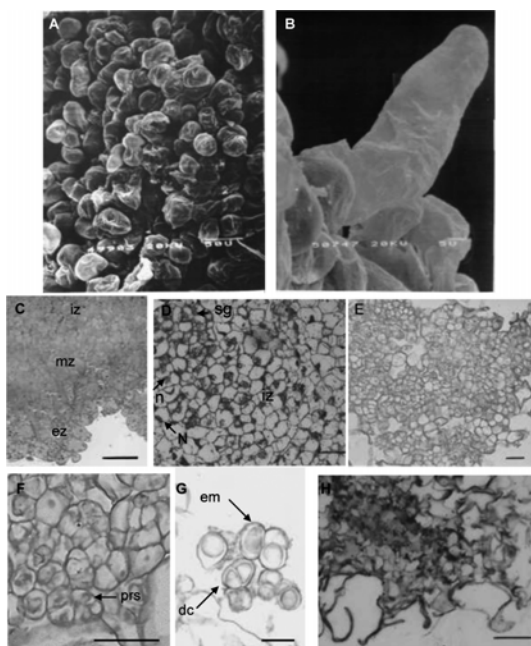
been reported for bananas nor plantains. Clearly, our results stress the importance of keeping the primary globular embryos of Williams banana in induction media containing auxins to obtain highly competent calluses for the production of further globular somatic embryos. Komamine (2003) worked with suspensions of carrot cells and found that auxins contribute the induction of somatic embryos until a globular stage is reached, but inhibit their further development to other embryonic stages thereafter.

The longitudinal sections of immature flowers grown in callus-induction medium, as compared with the initial explants, showed the formation of globular primary somatic embryos and proembryonic structures derived from parenchyma cells that remain close to vascular traces (figure 1Q).

**Morphoanatomy of embryogenic and non-embryogenic calluses.** The distinctive features of embryogenic calluses were their creamy-white color, lax granular structure and the presence of somatic embryos, chiefly globular in shape, around their periphery (figures 1M and 2A). These calluses presented three distinguishable regions, that is, external, middle and internal. The former showed several layers of embryogenic cells and some loosely arranged proembryonic structures (figure 2B-2D-F) which caused that most of this region peeled off and was lost during sample processing. The medial zone contained cells with irregular shapes, with a high mitotic index. Such cell shape modifications might

side observada en otras especies, especialmente en medios sin auxinas (Urbanek *et al.*, 2004).

En el cuarto mes de cultivo, se detectaron embriones somáticos primarios a nivel del tercio inferior de los tépalos y en la parte externa (figure 1I) e interna (figuras 1J-1K) de las flores. Estos embriones se encontraban en su mayoría en estado globular, inicialmente presentaron una superficie lisa brillante (figura 1J-1K), que luego cambió hacia rugosa debido a la proliferación celular (figuras 1L, 1N-1P). Estos embriones no pasaron a los siguientes estados embrionarios, sino que se desviaron hacia la producción y liberación de células embriogénicas, que permanecieron en la periferia del embrión primario (figura 1L) dando origen al callo embriogénico con nuevos embriones (figura 1M). La presencia de embriones somáticos globulares contribuye a la formación de callos embriogénicos con alto potencial para la formación de embriones globulares en el cultivo de las flores de banano Williams; este hallazgo no había sido reportado en plátano ni en banano. Obviamente, este resultado muestra la importancia de mantener los embriones primarios globulares del banano Williams en medio de inducción que contenga auxinas para obtener callos altamente competentes para la producción de futuros embriones somáticos globulares. Komamine (2003) trabajó con suspensiones celulares de zanahoria y encontró que las auxinas favorecen la inducción de embriones somáticos hasta alcanzar el estado globular, pero luego inhibieron su desarrollo hacia los siguientes estados embriogénicos.



**Figure 2. Embryogenic and non-embryogenic calluses of immature male flowers from Williams banana. A) Scanning-electron micrograph of embryogenic callus. B-C) Semi-fine slice of embryogenic callus. D-F) Transversal slice of the external zone of embryogenic callus. G) Scanning-electron micrograph of non-embryogenic callus. H) Semi-fine slice of non-embryogenic callus. dc, dividing cell. em, embryogenic cell. ez, external zone. iz, internal zone. ic, elongated cell. mz, mid-zone. N, nucleolus. n, nucleus. prs, proembryonic structure. rc, round cell, sa, senescent aspect. sg, starch granule. Bars: A, B-E, H = 50  $\mu$ m; G = 5  $\mu$ m; F = 100  $\mu$ m.**

**Figura 2. Callos embriogénicos y no embriogénicos de flores masculinas inmaduras del banano Williams. A) micrografía electrónica de barrido de callos embriogénicos. B-C) cortes delgados de callos embriogénicos. D-F) cortes transversales de la zona externa de los callos embriogénicos. G) micrografía electrónica de barrido de los callos no-embriogénicos. H) cortes delgados de los callos no-embriogénicos. dc, células divididas. em. Células embriogénicas. ez, zona externa. iz. Zona interna. ic, células alargadas. mz, zona media. n, nucléolos. m, núcleo. prs, estructura pro-embriogénica. rc, célula redonda, sa, aspecto senescente. sg, gránulo de almidón. Barras: A, B-E, H = 50  $\mu$ m; G = 5  $\mu$ m; F = 100  $\mu$ m.**

be related to changes of cell wall that lead to the isolation of these cells (Mikula *et al.*, 2004).

The inner region was mainly composed by cells with pentagonal or hexagonal shapes, which allow a maximal connection among cells and a greater stability of the tissues, this has been described for the embryogenic callus of beetroot (Moghaddam and Taha, 2005). Both the external and the internal zones showed stored substances mainly in the form of starch granules located around the cell nuclei or rarely dispersed in the cytoplasm, with a higher content of starch granules in the inner zone. Sections of embryogenic callus revealed that the external region contain proembryonic structures and small round or ovoid embryogenic cells, with a dense cytoplasm, thick walls and a large nucleus (figures 2D-2F). These later features are characteristic of embryogenic cells, which have cells with high metabolic activity, large RNA synthesis (Komamine, 2003) and high levels of cytoplasmic components (Mikula *et al.*, 2004).

The features we observed in the embryogenic cells of Williams banana agree with other descriptions of callus cells from *Musa* and other embryogenic suspensions (Jalil *et al.*, 2003; Houllou *et al.*, 2005); however, those studies did not indicated the location of the cells within the embryogenic calluses, nor their structure.

The non-embryogenic calluses of the studied flowers showed two types of structure, a loose one with elongated hyaline cells around the periphery and elongated structures (figures 1D-1E)

Las secciones longitudinales de flores inmaduras cultivadas en medio de inducción de callo, comparadas con las del explante inicial, mostraron la formación de embriones somáticos globulares primarios y estructuras proembriónicas a partir de las células del parénquima que se encuentran cercanas a las trazas vasculares (figura 1Q).

### **Morfoanatomía de los callos embriogénicos y no embriogénicos.**

Las características más importantes de los callos embriogénicos fueron su color blanco-crema, estructura granular, laxa y la presencia de embriones somáticos en su periferia, principalmente en estado globular (figuras 1M y 2A). En estos callos se distinguieron tres zonas: externa, media e interna. La primera mostró varias capas de células embriogénicas y estructuras proembriónicas dispuestas laxamente (figuras 2B-2D-F), lo que ocasionó que se desprendiera gran parte de esta zona durante el procesamiento de las muestras. La zona media contenía células con formas irregulares, con un alto índice mitótico. Las modificaciones en la forma de la célula pueden estar relacionadas a cambios en la pared celular que conduzcan al aislamiento de estas células (Mikula *et al.*, 2004).

La región interna estuvo mayormente compuesta por células con forma pentagonal y hexagonal, las cuales permitieron una completa conexión entre las células, y una gran estabilidad de los tejidos, esto también ha sido descrito para los callos embriogénicos en remolacha (Moghaddam and Taha, 2005). Las zonas externas e internas mostraron sustancias almacenadas



and a watery one with round cells and round structures of crystalline creamy-yellow color (figures 1F-1G). The sections of these non-embryogenic calluses also revealed that they are composed by large cells of variable shape, with a predominance of elongated (figure 2G) ones with little and uneven cytoplasmic contents, and senescent aspect (figure 2H). Such features resemble those found in embryogenic suspensions from Maçã (AAB) plantain (Houllou *et al.*, 2005), even though these studies do not point out aspects about the variability of cell shape, poor and unequal cytoplasmic content and senescent appearance.

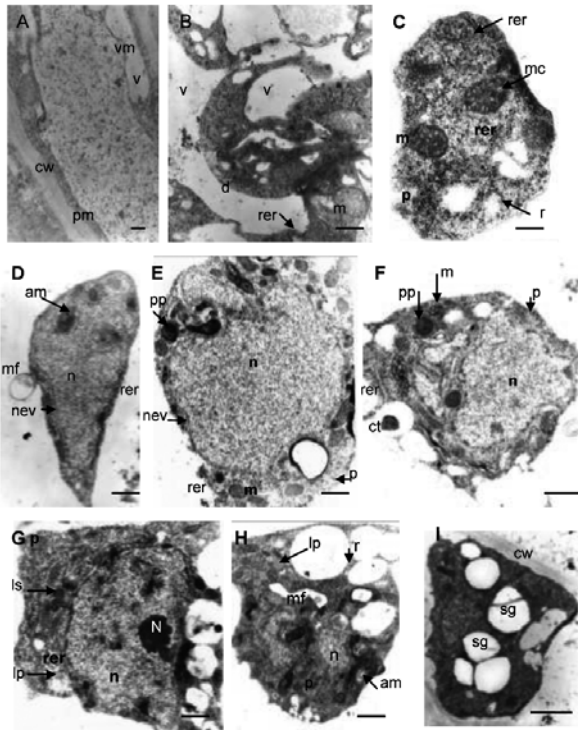
**Ultrastructure of embryogenic and non-embryogenic callus cells.** The cell wall and some components of the protoplast were examined in the cells of embryogenic calluses (figure 3). The protoplast, enclosed by the cell wall, is surrounded by the plasma membrane and contains the protoplasm (cytoplasm plus nucleus), vacuoles and other some cytoplasmic inclusions and structures.

The following structures were seen in the cytoplasm: 1) the plasma membrane located between the cell wall and the protoplasm (figure 3A), 2) endoplasmic reticulum, dictyosomes, nuclear envelope and vacuolar membrane (figures 3A-3E), 3) free ribosomes in the cytoplasm, as well as some adhered to the rough endoplasmic reticulum, and small groups of ribosomes forming polysomes (figures 3B-3D), 4) mitochondria that looked like small round or ovoid organelles with a double membrane and abundant prominent

mayormente en forma de gránulos de almidón ubicados alrededor del núcleo celular o raramente esparcidos en el citoplasma, siendo más alto el contenido de gránulos de almidón en la zona interna. Las secciones de callos embriogénicos mostraron que la zona externa contiene estructuras proembriónicas y células pequeñas, algo redondeadas u ovoides con un citoplasma denso, paredes gruesas y un núcleo grande (figuras 2D-2F). Estas últimas características son típicas de células embriogénicas, en las que ocurre alta actividad metabólica, gran síntesis RNA, (Komamine, 2003) y altos niveles de otros componentes citoplasmáticos (Mikula *et al.*, 2004).

Las características observadas en las células embriogénicas del banano Williams coinciden con las descripciones en las células de callo de *Musa* y otras suspensiones embriogénicas (Jalil *et al.*, 2003; Houllou *et al.*, 2005); no obstante, esos estudios no indicaron la ubicación de las células dentro de los callos embriogénicos ni de su estructura.

Los callos no embriogénicos de las flores estudiadas mostraron dos tipos de estructuras, una suelta con células alargadas hialinas alrededor de la periferia y estructuras alargadas (figuras 1D-1E), y otra acuosa con células redondas y estructuras redondas de un color amarillo crema (figuras 1F-1G). Las secciones de estos callos no embriogénicos también mostraron que estaban compuestos por células grandes, de forma variable predominando las de forma alargada (figura 2G), con poco o desigual contenido citoplasmático y aspecto senescente (figura 2H). Estas características se ase-



**Figure 3.** Transmission-electron micrographs of embryogenic callus obtained from immature male flowers of Williams banana A-I) Sections of external part of callus. am, amyloplast. ct, crystal. cw, cell wall. d, dictyosome. lp, drop of lipid. ls, lysosome. m, mitochondria. mc, mitochondrial crest. mf, myelin figure. N, nucleolus. n, nucleus. nev, nuclear envelope. p, polysome. pm, plasma membrane. pp, proplastid. r, ribosome. rer, rough endoplasmic reticulum. sg, starch granule. v, vacuole. vm, vacuolar membrane. Bars: A = 0.8  $\mu$ m; B,C = 0.4  $\mu$ m; D,F-H = 1  $\mu$ m; E = 0.85  $\mu$ m; I = 2  $\mu$ m.

**Figure 3.** Micrografías al microscopio electrónico de transmisión de callos embriogénicos obtenidos de flores masculinas inmaduras del banano Williams A-I) Partes del zona externa de los callos- am, amiloplasto, ct., Cristales. Cw, pared celular. D) dictiosoma. Ip, gotas de lípid. Is, liposoma. m, mitocondria. mc, cresta de la mitocondria. mf, figura de mielina. N nucléolo, n, núcleo, nev envoltorio nuclear. p, polisoma. pm, membrana plasmática. pp. proplastidios. r, ribosoma. rer, retículo endoplasmico rígido. sg, gránulo de almidón. v. vacuola. vm, membrana vacuolar. Barras: A = 0,8  $\mu$ m; B,C = 0,4  $\mu$ m; D,F-H = 1  $\mu$ m; E = 0,85  $\mu$ m; I = 2  $\mu$ m.

mitochondrial crests (figures 3B,3C,3E,3F), 5) plastids with a very dense internal content, surrounded by a double membrane (figure 3D-3F). Both mitochondria and plastids appeared to be evenly distributed in the cytoplasm and around the nucleus.

The cells of non-embryogenic calluses also showed the same structural components of cell walls and protoplast as the embryogenic ones, although the former had a thinner cell wall, little cytoplasmic contents and one or a few large vacuoles (figure 4A-4I). The cell wall of embryogenic cells was thicker (0.6 to 0.8  $\mu\text{m}$ ) (figure 3A) than that of the non-embryogenic ones (0.1 to 0.5  $\mu\text{m}$ ) (figure 4A). These findings were comparable to results described for sugar beet (Moghaddam and Taha, 2005), although in this specie the cell wall thickness was larger, 2  $\mu\text{m}$  in embryogenic callus cells and 0.5  $\mu\text{m}$  in the non-embryogenic ones.

The volume ratio of nucleus to cytoplasm was higher (0.6) in embryogenic cells than in non-embryogenic ones; the former had a denser cytoplasm with the presence of rough endoplasmic reticulum and moderate numbers of ribosomes, polysomes and mitochondria (figure 3, table 2). These three structures within the cytoplasm indicate a high cellular and metabolic activity in these cells, such as protein synthesis, in various tissues (Paniagua *et al.*, 2002). In contrast, studies using sugar beet found that their embryogenic cells contained scarce rough endoplasmic reticulum structures and few polysomes, whereas they were rich in smooth endoplasmic reticulum

mejan con las encontradas en suspensiones embriogénicas en plátano Maçã (AAB) (Houllou *et al.*, 2005), a pesar que estos estudios no se enfocan en los aspectos de variabilidad de la forma celular, poco o desigual contenido citoplasmático y aspecto senescente.

**Ultraestructura de las células callosas embriogénicas y no embriogénicas.** La pared celular y algunos componentes del protoplasma se observaron en las células de los callos embriogénicos (figura 3). El protoplasma, envuelto por la pared celular, está rodeado por la membrana plasmática y contiene el protoplasma (citoplasma mas núcleo), vacuolas y otras estructuras citoplasmáticas.

Se observaron las siguientes estructuras en el citoplasma: 1) la membrana plasmática localizada entre la pared celular y el protoplasma (figure 3A), 2) el retículo endoplasmático, dictiosomas, cubierta nuclear y membrana vacuolar (figures 3A-3E), 3) ribosomas libres en el citoplasma, al igual que algunos adheridos al retículo endoplasmático rugoso, y pequeños grupos de ribosomas que forman polisomas (figuras 3B-3D), 4) mitocondrias como pequeños orgánulos redondos y ovalados con una membrana doble y abundantes crestas mitocondriales prominentes (figuras 3B, 3C, 3E, 3F), 5) plastidios con contenido interno muy denso rodeados por una doble membrana (figura 3D-3F). Las mitocondrias y los plastidios estuvieron distribuidos en el citoplasma y alrededor del núcleo.

Las células de callos no embriogénicos también mostraron los mismos componentes estructurales de las paredes celulares y el protoplasma,

**Table 2. Contents of cytoplasmic structures in cells of embryogenic (EC) and non-embryogenic (NC) calluses from immature male flowers of Williams banana.****Cuadro 2. Contenido de estructuras citoplasmáticas en las células de callos embriogénicos (EC) y no embriogénicos (NC) de flores masculinas inmaduras en banano Williams.**

Cytoplasmic structure	EC calluses	NC calluses
Rough endoplasmic reticulum	*	*
Dictyosomes	+	+
Ribosomes	+++	+
Polysomes	+++	+
Mitochondria	+++	++
Plastids	+++	Nd
Lipid drops	++	+
Lysosomes	+	Nd
Myelin figures	+	Nd
Bodies with crystals	+	Nd

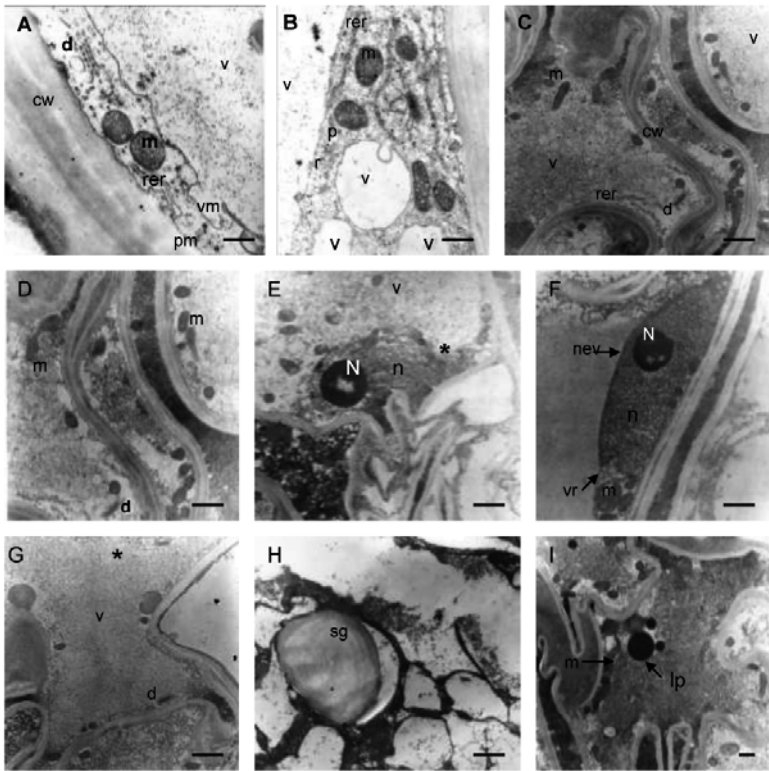
Nd= not detected, \*= present, += very few, ++= few, +++= moderate numbers.

(Moghaddam and Taha, 2005), an indicator of high levels of lipid synthesis.

The large numbers of mitochondria seen in the embryogenic cells implies high consumption of metabolic energy. Those cytoplasmic structures had a dense matrix and many prominent mitochondrial crests (figure 4C), a typical indicator of elevated respiratory activity (Mikula *et al.*, 2005). These mitochondria participate in the oxidation of carbohydrates and lipids, as they contain enzymes involved in the Krebs cycle and in oxidative phosphorylation to produce ATP. The abundance of dictyosomes within cells might be related to thicker cell walls or to the synthesis of glycoproteins such as the lysosomal ones (Paniagua *et al.*, 2002). Work carried out using *Ranunculus*

como sucedió con los callos embriogénicos; aunque el primero tuvo una pared celular fina, poco contenido citoplasmático y una o muy pocas vacuolas grandes (figura 4A-4I). La pared celular de las células embriogénicas era más gruesa (0,6 a 0,8  $\mu\text{m}$ ) (figura 3A) que la de las células no embriogénicas (0,1 a 0,5  $\mu\text{m}$ ) (figura 4A). Estos hallazgos se compararon con los resultados obtenidos en remolacha (Moghaddam y Taha, 2005), aunque en esta especie el engrosamiento de la pared celular era mayor, 2  $\mu\text{m}$  en las células de callos embriogénicos y 0,5  $\mu\text{m}$  en las de los no embriogénicos.

La proporción de volumen del núcleo al citoplasma fue mayor (0,6) en células embriogénicas que en células no embriogénicas; la primera tuvo un citoplasma más denso con la presencia de un retículo endoplasmático



**Figure 4.** Transmission-electron micrographs of non-embryogenic calluses obtained from immature male flowers of Williams banana. A-D) Sections of external part of callus. cw, cell wall. d, dictyosome. lp, drop of lipid. m, mitochondria. N, nucleolus. n, nucleus. nev, nuclear envelope. p, polysome. pm, plasmatic membrane. rer, rough endoplasmic reticulum. r, ribosome. sg, starch granule. v, vacuole. \*, ruptured of the vm or nev. vm, vacuolar membrane. vr, vesicular rest. Bars: A,B = 0.3  $\mu\text{m}$ ; C,E = 1.5  $\mu\text{m}$ ; D = 1.1  $\mu\text{m}$ ; F = 0.85  $\mu\text{m}$ ; G = 2  $\mu\text{m}$ ; H,I = 1  $\mu\text{m}$ .

**Figura 4.** Micrografías al microscopio electrónico de transmisión de callos no-embriogénicos obtenidos de flores masculinas inmaduras del banano Williams. A-I) partes del área externa de los callos. cw, pared celular. D, dictiosoma. lp, gotas de lípido. m, mitocondria. n, nucléolos, n, núcleo. nev, envoltorio nuclear. p, polisoma. pm, Membrana plasmática. rer, retículo endoplasmático rugoso. r, ribosoma. sg, gránulo de almidón. v, vacuola. \*, ruptura vm o nev. vm, membrana vacuolar. vr, restos vesiculares. Barras: A,B = 0,3  $\mu\text{m}$ ; C,E = 1,5  $\mu\text{m}$ ; D = 1,1  $\mu\text{m}$ ; F = 0,85  $\mu\text{m}$ ; G = 2  $\mu\text{m}$ ; H,I = 1  $\mu\text{m}$ .

*sceleratus* has indicated that its embryogenic callus cells and embryos have a cytoplasm rich in free ribosomes, polysomes and mitochondria (Thomas *et al.*, 1971).

Both embryogenic and non-embryogenic cells of the male flowers of Williams banana plant (this study) showed a nucleus with a single nucleolus (figures 3E-3H and 4E-4F); the size of the nucleus was very similar in both types of cells (22 and 23  $\mu\text{m}^2$ , respectively). Though when comparing the ratio of nucleus to cytoplasm with regard to cell size, clearly the nucleus was larger in embryogenic cells. Their nucleolus appeared as a rough spherical body (1.8  $\mu\text{m}$ ), very dense, whereas that of the non-embryogenic ones (3.1  $\mu\text{m}$ ) showed a dense region surrounded by one to three less dense zones (figure 4F). Most of both types of cells showed a single nucleolus; this is probably related to cell division phases, interphase (nucleolus present) or prophase or beginning of metaphase (nucleolus absent). In this regard, it is well known that plant cells able to divide present one or two very evident nucleolus during interphase, which is the only stage in which DNA replicates, and new RNA and proteins are synthesized (Paniagua *et al.*, 2002).

Non-embryogenic cells showed a single large vacuole occupying most of the cell space, sometimes accompanied by smaller vacuoles and occasionally by several very small vacuoles (figures 4A-4C). Whereas embryogenic cells usually contained few small vacuoles, and occasionally, a larger one with some smaller ones (figures 3A-3B). The presence of larger vacuoles may be a

rugoso y un número moderado de ribosomas, polisomas y mitocondrias (figura 3, cuadro 2). Estas tres estructuras dentro del citoplasma indican una gran actividad celular y metabólica en estas células como la síntesis de proteínas en distintos tejidos (Paniagua *et al.*, 2002). Por el contrario, estudios llevados a cabo en remolacha determinaron que sus células embriogénicas contenían bajos niveles de retículo endoplasmático rugoso y polisomas, y altos de retículo endoplasmático liso (Moghaddam y Taha, 2005), lo cual es un indicador de una alta síntesis de lípidos.

El gran número de mitocondrias observado en las células embriogénicas supone un alto consumo de energía metabólica. Esas estructuras citoplasmáticas presentaron una matriz densa y muchas crestas mitocondriales prominentes (figura 4C), lo cual es un indicador típico de una actividad respiratoria elevada (Mikula *et al.*, 2005). Estas mitocondrias participan en la oxidación de carbohidratos y lípidos, y contienen enzimas relacionadas con el ciclo Krebs y en la fosforilación oxidativa para producir ATP. La gran cantidad de dictiosomas dentro de las células puede estar relacionada con el engrosamiento de la pared celular o con la síntesis de glicoproteínas como las lisosomales (Paniagua *et al.*, 2002). La investigación llevada a cabo en *Ranunculus sceleratus* indicó que las células de callo embriogénicas y embriones tienen un citoplasma rico en ribosomas libres, polisomas y mitocondrias (Thomas *et al.*, 1971).

Las células embriogénicas y no embriogénicas de las flores masculinas



consequence of the fusion of smaller ones, this is a characteristic of mature plant cells. The main functions of plant cells vacuoles are related to the maintenance of cell shape, and the geometry of plasma membrane surface (Moghaddam and Taha, 2005). Our findings agree with results described in the banana "Maçã" (Houllou *et al.*, 2005) however in sugar beet the embryogenic cells show few vacuoles larger than those observed in non-embryogenic cells (Moghaddam and Taha, 2005).

The studied cells contained plastids, drops of lipids, lysosomes, myelin figures and bodies with crystals in low numbers but they were always higher in the embryogenic cells (table 2, figures 3 and 4). Just for the sake of comparison, the cells of embryogenic calluses and embryos of *Ranunculus sceleratus* contain prominent amyloplasts and abundant spherosomes (Thomas *et al.*, 1971).

Our studies reveal that the plastids, amyloplasts and proplastids, were present around the nucleus (figures 3D-3F, 3H). The proplastids contained some starch granules (figures 3H, 3I) and lipid drops, without grain organization, and occasionally they showed a slight organization of their inner membrane. Proplastids looked like immature small plastids with few starch and dense matrix. These observations suggest that proplastids are associated to the embryogenic condition of the callus derived from the immature male flowers 1.5 cm long. The meristematic capacity of cells was associated with quantity of amyloplasts and proplastids (Fahn, 1967), as proplastid division

del banano Williams (en el presente estudio) mostraron un núcleo con un solo nucléolo (figuras 3E-3H y 4E-4F); el tamaño del núcleo fue muy similar en ambos tipos de células (22 y 23  $\mu\text{m}^2$ , respectivamente). Sin embargo, al comparar la proporción de núcleo a citoplasma con respecto al tamaño de la célula, claramente el núcleo era más grande en las células embriogénicas. Sus nucléolos tenían un cuerpo esférico rugoso (1,8  $\mu\text{m}$ ), muy denso, mientras que los nucléolos de los no embriogénicos (3.1  $\mu\text{m}$ ) mostraron un área densa que contenía de una a tres áreas menos densas (figura 4F). La mayoría de los dos tipos celulares mostraron un solo nucléolo; esto puede estar relacionado con las fases de división celular, interfase (núcleolo presente) o pro-fase o inicio de la metafase (núcleolo ausente). En este sentido, es bien conocido que las células de las plantas capaces de dividirse, tienen uno o dos nucléolos bien distintivos durante la interfase, único momento cuando se replica DNA, y se sintetizan las proteínas (Paniagua *et al.*, 2002).

Las células no embriogénicas mostraron una sola vacuola grande que ocupaba la mayor parte del espacio celular, algunas veces acompañada de vacuolas pequeñas y en ocasiones de muchas vacuolas pequeñas (figuras 4A-4C). Las células embriogénicas normalmente contenían varias vacuolas pequeñas, y ocasionalmente, una grande con otras pequeñas (figuras 3A-3B). La presencia de vacuolas más grandes puede ser el resultado de la integración de vacuolas más pequeñas, esto es una característica de células de plantas maduras. La función prin-

occurs at the same time as cell division. Unlike our findings in Williams banana, the embryogenic callus cells of *Gentiana punctata* usually show numerous starch grains (Mikula *et al.*, 2004).

The drops of lipids (this study) appeared as spheres without a membrane. In the embryogenic callus cells there were few, looking like clear drops (figures 3G, 3H), whereas in non-embryogenic callus cells they appeared as black drops or spheres, indicating a high degree of unsaturated fatty acids; comparable lipid drops have been described in cellular aggregates of carrots (Street and Withers, 1974).

Lysosomes showed to contain very dense and variable diameter (0.2 to 0.6  $\mu\text{m}$ ) (figures 3G) in cells from embryogenic calluses. These autophagic vacuoles or autophagosomes seemingly emerge from the *trans* side of dictyosomes and they contain acid hydrolases required for intracellular digestion (Paniagua *et al.*, 2002). Myelin figures were scarce and they showed concentric membranes (figures 3D, 3H); this scarcity contrasts with findings in cellular aggregates of carrots in suspension cultures, in which such structures are usually present (Street and Withers, 1974).

In embryogenic callus cells were detected crystals inside spherical bodies of 0.2 to 0.8  $\mu\text{m}$  diameter (figure 3F), that sometimes lost the granular content. The features of those bodies resemble those of peroxisomes, which contain crystalline structures, which generally are the urate oxydase enzyme. The functions of this enzyme may be related to the metabolism of

principal de las vacuolas de las células están relacionadas al mantenimiento de la forma de la célula, y la geometría de la superficie de la membrana plasmática (Moghaddam y Taha, 2005). Los hallazgos de esta investigación están relacionados con los resultados descritos en el banano "Maçã" (Houllou *et al.*, 2005), sin embargo, en remolacha las células embriogénicas mostraron pocas vacuolas grandes en comparación con las observadas en las células no embriogénicas (Moghaddam y Taha, 2005).

Las células estudiadas contenían plastidios, gotas de lípidos, lisosomas, figuras mielínicas y cuerpos con cristales, y aunque con un bajo número siempre se mantenían más altas en las células embriogénicas (cuadro 2, figuras 3 y 4). Con fines de comparación se puede señalar que las células de callo y embriones de *Ranunculus sceleratus* contienen amiloplastos prominentes y abundantes esferosomas (Thomas *et al.*, 1971).

El presente estudio reveló que los plastidios, amiloplastos y proplastidios estuvieron presentes cerca del núcleo (figuras 3D-3F, 3H). Los proplastidios tenían algunos gránulos de almidón (figuras 3H, 3I) y gotas de lípidos, sin ninguna organización del grano, y en ocasiones presentaron una leve organización en su membrana interna. Los proplastidios parecían como plastidios pequeños inmaduros con poco almidón y una matriz densa. Estos hallazgos sugieren que los proplastidios están relacionados con la condición embriogénica de los callos derivados de flores masculinas inmaduras de 1,5 cm de largo. La capacidad meristemática de las células estuvo

hydrogen peroxide, to collaborate with some of the functions of mitochondria and chloroplasts (Paniagua *et al.*, 2002). Possibly these bodies containing crystals with low amounts of some hydrolytic enzymes that leads to a reduction of their size as the cells get ready for division (Paniagua *et al.*, 2002; Yeoman and Street, 1973).

In this context, it should be emphasized that in our study several cells of non-embryogenic callus showed very irregular shapes, unequal cytoplasmic contents (figures 4C-4I), and intercellular spaces with accumulation of unidentified materials (figure 4E), and they appeared to be undergoing necrosis or blackening (figures 4C-4I). This latter aspect was notorious due to the loss of nuclear envelope in some areas of the nucleus (figure 4E), the presence of ruptured vacuoles (figure 4G), collapsed nuclei and mitochondria (figures 4E, 4I), the accumulation of vesicular remains or rests (figure 4F) and some zones of the cytoplasm very dark (figure 4C, 4D, 4G, 4I).

## Conclusion

The morphoanatomical observations in this study showed that the embryogenic calluses of Williams banana plants could be generated from primary somatic embryos formed by direct embryogenesis on immature male flowers cultured in callus-induction medium containing auxins. The embryogenic callus developed numerous somatic embryos of globular shape around their periphery. The primary somatic embryos on the explants represent an early

asociada con la cantidad de amiloplastidios y proplastidios (Fahn, 1967) al tiempo que ocurre la división de los proplastidios ocurre la división celular. A diferencia de lo encontrado en el banano Williams, las células de callos embriogénicos de *Gentiana punctata* normalmente presentaron una gran cantidad de granos de almidón (Mikula *et al.*, 2004). Las gotas de lípido (en el presente trabajo) aparecen como esferas sin membrana. En las células de callos embriogénicas hubo pocas, y parecían como gotas claras (figuras 3G, 3H), mientras que en las células de callo no embriogénico parecían como gotas o esferas negras, indicativo de un alto grado de insaturación de los ácidos grasos; comparable a las gotas de lípido descritas en agregados celulares de zanahoria (Street and Withers, 1974).

Los lisosomas eran bastante densos y tenían un diámetro variable (0,2 a 0,6  $\mu\text{m}$ ) en las células de callos embriogénicos. Estas vacuolas autofágicas o autofagosomas emanan de la cara *trans* de los dictiosomas, y contienen hidrolasas ácidas, requeridas para la digestión intracelular (Paniagua *et al.*, 2002). Las figuras mielínicas fueron escasas y mostraron membranas concéntricas (figuras 3D, 3H); esta escasez contrasta con los resultados de agregados celulares de zanahoria en cultivos de suspensión, donde éstas estructuras están usualmente presentes (Street and Withers, 1974).

En las células de callos embriogénicos se detectaron cristales dentro de cuerpos esféricos entre 0,2 a 0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro (figura 3F), que en ocasiones se perdieron en el conte-

morphological marker of the somatic embryogenesis of Williams banana plants.

The ultrastructural studies revealed that the embryogenic callus cells contain a moderate number of mitochondria, proplastids and plastids, and a very low content of lipid drops; the non-embryogenic callus cells contained few mitochondria, scarce drops of lipids and no plastids. The plastids and drops of lipids seen both in the cells of embryogenic callus constitute possible stores for the next embryony stages. Those cytoplasmic structures might be related to the embryogenic stage of development of the cells. Our results open an interesting view in the studies of somatic embryogenesis in bananas, in which many of such aspects remain to be elucidated.

## Acknowledgements

Finnacial support: Fundación UCV through the Project No. 0297/2006 and Vicerrectorado Académico de la Universidad del Zulia for the Grant for Graduate studies in Botany at the Universidad Central de Venezuela. Thanks to the Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias at the Universidad Central de Venezuela, for allowing us to undertake this study. Likewise, thanks to the technicians Aurea Beatriz Bello and Nuri Díaz for their help in preparing the samples for transmission and scanning electron microscopy, and to Lic. Ander Abrisqueta for the micrographs.

nido granular. Las características de esos cuerpos se parecían a los peroxisomas, los cuales tienen estructuras cristalinas, que son generalmente enzimas urato oxidadas. La función de estas enzimas puede estar relacionada al metabolismo de peróxido de hidrógeno para colaborar con alguna de las funciones de mitocondria y cloroplastos (Paniagua *et al.*, 2002). Probablemente, estos cuerpos que contienen cristales con poca cantidad de enzimas hidrolíticas que conducen a la reducción de sus tamaños al tiempo que las células se disponen a la división (Paniagua *et al.*, 2002; Yeoman y Street, 1973). Es importante resaltar que en la presente investigación, varias de células de callos no embriogénicos mostraron formas irregulares, contenido citoplasmático desigual (figuras 4C-4I) y espacios intercelulares con acumulación de materiales sin identificar (figura 4E) que parecieran estar sufriendo de necrosis (figuras 4C-4I). El último aspecto fue notable debido a la pérdida de la envoltura nuclear en algunas áreas del núcleo (figura 4E), la presencia de vacuolas rotas (figura 4G), núcleos y mitocondrias colapsadas (figuras 4E, 4I), acumulación de restos vesiculares (figura 4F) y algunas áreas oscuras del citoplasma (figura 4C, 4D, 4G, 4I).

## Conclusión

Las observaciones morfoanatómicas en esta investigación mostraron que los callos embriogénicos de las plantas del banano Williams pueden

## Literature cited

- Arteaga, M., E. García and E. Vargas. 2002. Embriogénesis somática a partir de flores masculinas en clones de banano. *Phyton* 68: 199-206.
- Escalant, J., C. Teissont and F. Côte. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 30: 181-186.
- Fahn, A. 1967. *Plant Botany*. First English Edition. Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford. 534 p.
- FEDEAGRO. 2012. Estadísticas Agrícolas. Venezuela. In: <http://www.fedeagro.org/agricola> (cited 14 Nov 2012).
- Fehér, A., T. Pasternak and D. Dubits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74: 201-208.
- Houllou, L., E. Kido, M. Falco, M. Silva, A. Vargas, N. Nogueira, M. Lanzoni and A. Tulman. 2005. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 1081-1086.
- Jalil, M., N. Khalid and R. Othman. 2003. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv Mas (AA). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75: 209-214.
- Komamine, A. 2003. My way with plant cell cultures: significance of experimental systems in plant biology. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 39: 63-74.
- Mikula, A., T. Tykarska, K. Mieczyslaw and J. Rybczyński. 2005. Somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* (L.): histological and ultrastructural changes in seedling hypocotyl explant. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 41: 686-694.
- Mikula, A., T. Tykarska, M. Zielińska, M. Kurace and J. Rybczyński. 2004.

generarse de embriones somáticos primarios formados por embriogénesis directa en flores masculinas inmaduras cultivadas en medio de inducción de callo con auxinas. Los callos embriogénicos desarrollaron numerosos embriones somáticos con forma globular alrededor de la periferia. Los embriones somáticos primarios en los explantes representaron un marcador morfológico de la embriogénesis somática de las plantas de banano Williams.

Los estudios ultraestructurales revelaron que las células de callos embriogénicos contienen un número moderado de mitocondrias, proplastidios y plastidios, y un bajo contenido de gotas de lípido, los callos no embriogénicos presentaron pocas mitocondrias y escasas gotas de lípido y plastidios. Los plastidios y gotas de lípido observados en las células de callos embriogénicos representan formas de almacenamiento para los siguientes estados embriogénicos. Esas estructuras citoplasmáticas pueden estar relacionadas con los estados embriogénicos de desarrollo de las células. Estos resultados ofrecen un punto de vista interesante en el estudio de la embriogénesis somática en banano, en el cual muchos aspectos se encuentran por aclarar.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación UCV por el apoyo económico brindado al proyecto N° 0297/2006 y al Vicerrectorado Académico de la Universidad del Zulia. De igual forma, los autores agradecen al Centro de Microscopía Electrónica de la Facul-

- Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 46: 109-120.
- Moghaddam, B. and R. Taha. 2005. Cellular behavior in embryogenic and non-embryogenic sugar beet calluses. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41: 465-469.
- Paniagua, R., M. Nistal, P. Sesma, M. Álvarez, B. Fraile, R. Anadón and F. Sáez. 2002. *Citología e Histología Vegetal y Animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales.* Paniagua, R. (ed) Tercera edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, S. A. U. 1002 p.
- Ramírez, M., E. de García and H. Lindorf. 2008. Cambios morfoanatómicos en los ápices del vástago y de la raíz del Williams (AAA, *Musa* spp.) bajo distintas concentraciones de N6-benciladenina. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 92: 53-72.
- Street, H. and L. Withers. 1974. The anatomy of embryogenesis in culture. *In*: Street, H. (Ed.). *Tissue Culture and Plant Science.* Academic Press Inc. (London) Ltd. Gand. p. 71-100.
- Strosse, H., H. Schoofs, B. Panis, E. Andre, K. Reyniers and R. Swenne. 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Science* 170: 104-112.
- Thomas, E., R. Konar and H. Street. 1971. The fine structure of the embryogenic callus of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Cell Science* 11: 95-109.
- Urbanek, A., B. Zechmann and M. Müller. 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Styrian pumpkin*: cytological and biochemical investigations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 329-340.
- Von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachock and L. Filonova. 2002. Review. Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ and Culture* 69:233-249.
- Yeoman, M. and H. Street. 1973. General cytology of cultured cells. *In*: Street, H. (ed). *Plant Tissue and Cell Culture.* Botanical monographs. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Vol. 11, p. 121-160.

---



---

*Fin de la versión en español*