

1 Criopreservación de Plantas Genero *Musa spp* Mediante Uso de Meristemos Apicales.

2 S.Korneva, R.Maribona K., J. Mendoza, F.Piña, O. Ruiz y R.H. Maribona.

3 Escuela Superior Politécnica de Litoral

4 Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador(CIBE)

5 Campus Politécnico „Gustavo Galindo V., Km 30,5 via Perimetral,Guayaquil, Ecuador.

6 Casilla 09-01-5863;Tlf:(593-4)2269610, faxⓉ593-4)2850747. skorneva@espol.edu.ec ; www.cibe.espol.edu.ec

7 **Abstract.** Fifteen accessions of different *Musa* genotypes proceeding from the *Musa* World-wide Collection INIBAP
8 (Transit Center, Catholic University of Louvain, Belgium), were received and *in vitro* multiplied previously. Apical
9 meristems (0,8-1 mm) were extracted from rooted plant of each accession and criopreserved in liquid nitrogen (-
10 196°C), after being pre-treated. In order to evaluate their viability, the criopreserved meristems were quickly thawed
11 (40°C), washed and cultured in MS modified medium. Results showed variations in survival from the preserved
12 meristems and neoformation of plants among the different evaluated accessions. Fifty and three percent of the
13 accessions displayed a percentage of buds neoformed between 30 and 63.3%. The worse behavior was observed in the
14 Malaccensis variety (ITC 0074). **Key words:** *apical meristems, cryopreservation, Musa spp.*

15 Resumen

16 Se trabajaron con 15 accesiones de diferentes genotipos de género *Musa spp*, procedentes de la Colección
17 Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica), las cuales fueron previamente
18 multiplicadas *in vitro*. Los meristemos apicales (0,8-1 mm), extraídas de las plantas enraizadas de cada
19 una de las accesiones, fueron sometidos a pre-tratamientos con criopreservantes y congelados en nitrógeno
20 líquido (-196°C). Para evaluar su posterior viabilidad, los meristemos criopreservadas fueron rápidamente
21 descongelados a 40°C, lavados y sembrados en el medio MS modificado. Los resultados obtenidos
22 mostraron dependencia varietal en cuanto a sobrevivencia de los meristemos crioconservados y formación
23 de nuevos brotes. El 53,3% de las accesiones evaluadas presentaron un porcentaje de brotes neoformados
24 entre 30 y 63,3% y el mas bajo porciento de brotes regenerados fue observado en la variedad
25 Malaccensis (ITC 0074). **Palabras claves:** *crioconservación, meristemos apicales, Musa spp.*

26

27 **Introducción**

28 Los bananos y plátanos están situados entre los principales renglones de economía en más de 100 países,
29 ubicados en las regiones tropicales y subtropicales incluyendo el Ecuador (Frison & Sharrock, 1999).

30 El establecimiento de bancos de germoplasma *in situ*, *in vitro* y mediante la criopreservación en nitrógeno
31 líquido resulta básico, no sólo para el desarrollo de un buen programa de mejoramiento genético, sino
32 como fuente de material inicial para la multiplicación acelerada de plantas *in vitro* de alta calidad genética
33 y fitosanitaria con fines comerciales. De los tres métodos existentes de preservación de un banco de
34 germoplasma, la crioconservación (-196°C) de material biológico es más simple y efectiva a mediano y
35 largo plazos (Panis, et al., 2002).

36 El objetivo de este trabajo ha sido conservar en nitrógeno líquido los meristemos apicales de plantas de
37 diferentes genotipos de *Musa spp* y evaluar su neoformación en plantas después de haber sido
38 descongeladas.

39 **Materiales y métodos**

40 Se emplearon vitroplantas de 15 accesiones de diferentes genotipos procedente de la Colección Mundial
41 de *Musa spp*. (Transit Center, Universidad Católica de Leuven, Bélgica). Estas fueron multiplicadas *in*
42 *vitro* en el medio de cultivo MS modificado (Murashige & Scoog, 1962) en presencia de 2,25mg/L de BAP,
43 con subcultivos mensuales hasta la obtención de la cantidad del material biológico necesaria para su
44 crioconservación (Panis, et al., 2001).

45 Criopreservación de meristemos apicales en nitrógeno líquido

46 Para inducir la tolerancia al frío en los tejidos de plantas iniciales, estas fueron sembradas en el medio
47 MS en presencia de 6% de sacarosa. Luego de 6-8 semanas, los meristemos apicales (0.8-1 mm) fueron
48 extraídos bajo observación en el microscopio estereo y colocados en el medio de cultivo líquido,
49 anteriormente mencionado, hasta concluir la extracción de todos los meristemos necesarias.
50 Posteriormente, los meristemos preparados fueron colocados en la solución LS en presencia de sacarosa
51 al 13.6%, con el propósito de provocar tolerancia a la deshidratación de los tejidos vegetales durante el
52 proceso de criopreservación. Pasados 20 minutos, los meristemos fueron reubicados en el criopreservante

53 PVS2, previamente enfriado a 4°C, en el que se mantuvieron durante otros 30 minutos. Los meristemos
54 apicales extraídos de la solución PVS2 fueron colocados sobre tiras enfriadas de papel de aluminio
55 estéril (4mmx15mm), introducidos en criotubos de 2ml y rápidamente sumergidos en nitrógeno líquido (-
56 196°C) (Panis, et al.,2001).

57 Neoformación de plantas a partir de los meristemos cryopreservados.

58 Para evaluar el efecto de la crioconservación, los meristemos conservados durante 30 minutos en nitrógeno
59 líquido fueron descongelados rápidamente a 40°C en agua y lavados durante 15 minutos en la solución
60 RS para eliminar la acción tóxica del DMSO. Los meristemos tratados fueron colocados sobre papel
61 filtro Whatman, ubicado en la superficie del medio de cultivo sólido MS en presencia de 0.3M de
62 sacarosa (Panis, et al., 2004), Luego de 24 horas, los meristemos fueron sembrados al medio sólido de
63 MS modificado MPK (Korneva y Maribona,1988), manteniéndose en la oscuridad durante los primeros
64 siete días. La sobrevivencia del material biológico crioconservado fue evaluada a los 2-4 semanas
65 después y su posterior neoformación en plantas transcurridos otros 1 - 2 meses.

66 Los medios de cultivo utilizados en este trabajo, tanto sólidos como líquidos, fueron esterilizados en
67 autoclave (Marquet Force Sterilizer) durante 20 minutos a 121°C y una atmósfera de presión.Los cultivos
68 se mantuvieron entre 28 - 30°C y 2500-3000 lux .

69 Evaluación estadística.

70 El efecto de la crioconservación sobre la cantidad de meristemos viables (sobrevivencia, Sm) y su
71 capacidad de formar nuevas plantas por cada accesión y grupo genómico, se evaluó mediante estadística
72 descriptiva univariada con el objetivo de estimar las medidas de tendencia central y la dispersión de cada
73 variable. Se empleó la transformación ArcSen (\sqrt{x}) con $0 \leq x \leq 1$ (Sokal y Rholf, 1981) para normalizar los
74 datos, comprobándose con la prueba de Shapiro-Wilks. Se aplicó la prueba F para comprobar la
75 homogeneidad de varianzas, procediéndose con posterioridad a realizar el análisis de varianzas y la
76 conformación de subgrupos homogéneos con el estadístico Tukey. Todas las pruebas estadísticas se
77 realizaron al 5% de significación y se emplearon los programas Infostat y SPSS 12.0.

78

79 Resultados

80 Criopreservación de los meristemos apicales .

81 Durante el pretratamiento del material biológico en el medio de MS con 6% de sacarosa, se observó un
82 desarrollo satisfactorio de la mayoría de las accesiones, con excepción de las variedades Malaccensis
83 (ITC 0074) y Banksii (ITC 0619) que presentaron un crecimiento lento, con menor diámetro de
84 pseudotallos y un pobre enraizamiento. Estos cultivos no estuvieron aptos para la extracción de los
85 meristemos apicales luego de cuatro semanas de pretratamiento en el medio indicado. Por tal razón, fue
86 necesario prolongar el período de pretratamiento hasta 8-10 semanas. El uso de un medio de cultivo
87 optimizado con una mayor concentración de AIA (hasta 0.5mg/L) y la inclusión de la kinetina, permitió
88 su buen enraizamiento y desarrollo, garantizando así las condiciones necesarias para extracción exitosa
89 de los meristemos apicales (Korneva y Maribona,1988).

90 Debido a que la extracción de un meristemo apical por un operador experimentado ocupa de 6-8 minutos,
91 los meristemos extraídos no pueden recibir el mismo tiempo de tratamiento con los criopreservantes.
92 Aunque en la literatura internacional se puede encontrar que los meristemos extraídos pueden permanecer
93 en la primera solución (LS) durante más de 5 horas sin afectación alguna (Panis, et al,2001), en nuestro
94 trabajo los meristemos recién extraídos de la planta fueron colocados, durante esta manipulación, en el
95 medio de cultivo líquido de pretratamiento hasta completar la cantidad necesaria de explantes para los
96 experimentos planificados, con el propósito a lograr que todo el material biológico recibiera un tratamiento
97 homogéneo.

98 Neoformación de plantas a partir de los meristemos apicales cryopreservados.

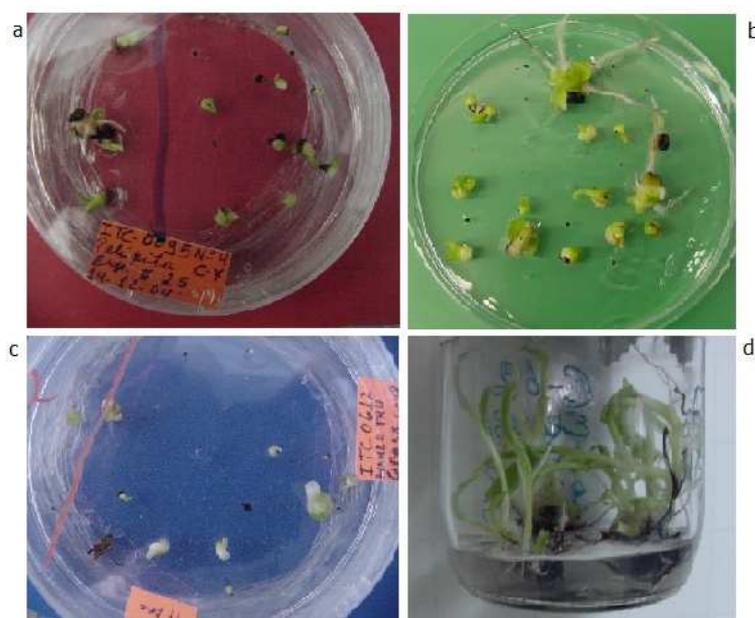
99 Veinticuatro horas después de siembra de los meristemos descongelados en el medio de cultivo en
100 presencia de 0.3M de sacarosa, se observó fenolización alrededor de algunos explantes debido a la
101 reacción enzimática del material sobreviviente con el medio de cultivo.

102 Luego de tres semanas, la mayoría de los explantes sembrados ya presentaron cambios en su coloración,
103 presencia de fenolización (parcial o completa) y diferente estado de desarrollo, incluyendo algunos con
104 evidente proliferación de brotes. Aunque en la literatura se describe la presencia frecuente de algunas

105 callosidades, en nuestro caso este fenómeno se observó muy pocas veces. Las evaluaciones posteriores
106 mostraron que los meristemos que no adquirieron otra coloración sino quedaron de color blanco o gris
107 fueron los tejidos muertos, afectados por frío. Las callosidades, fenolización de los tejidos, medios de
108 cultivo y observación visibles síntomas del desarrollo, en general, fueron los indicadores de que este
109 material vegetal sobrevivió la acción de ultra bajas temperaturas.

110 Las observaciones realizadas, confirmaron experiencias previas de los autores que relacionan la
111 sobrevivencia de los meristemos con el éxito de su extracción, lo que a su vez depende en gran parte de la
112 habilidad del operador, el tiempo de permanencia de los meristemos en criopreservantes antes y después de
113 la crioconservación y el efecto tóxico del DMSO entre otras causas.

114 Transcurridos 1-2 meses después de la siembra de meristemos en medio de cultivo MPK se observó el
115 desarrollo de brotes verdes de 2-3 mm de altura en los cultivos sobrevivientes (Figura 1). Sin embargo,
116 sorprendentemente, algunos meristemos de variedad banano Guineo (ITC 0005) comenzaron su desarrollo
117 después de 4 meses de haber sido descongelados y sembrados en el medio con 2,2 mg/l de BAP.



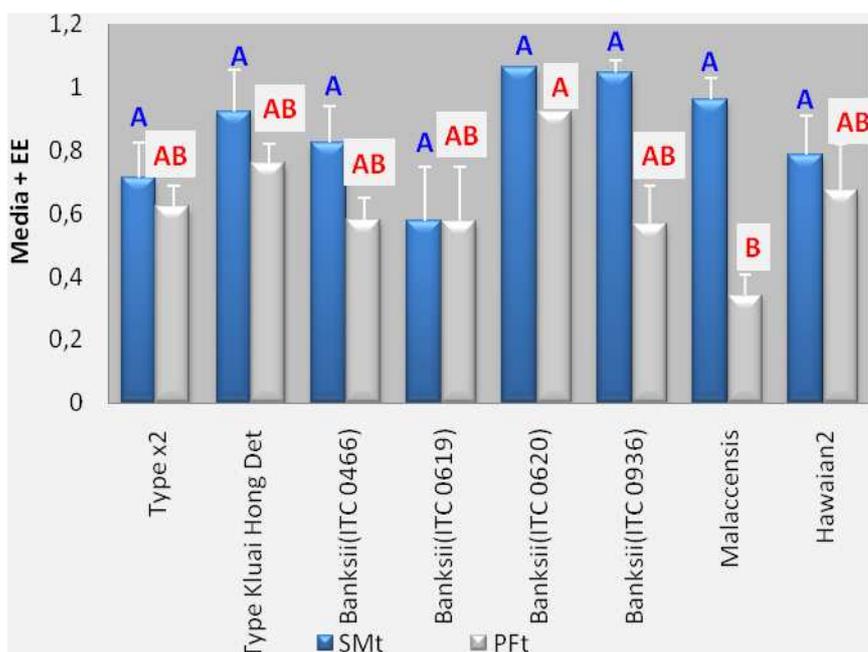
118
119 **Figura 1.** Brotes neoformados luego de la crioconservación (-196°C) de meristemos apicales de diferentes
120 variedades de *Musa spp.*, pertenecientes a diferentes grupos genómicos: a) variedad *Pelipita* (ABB);
121 b) *Musa acuminata* tipo *Klwai Hong Det*; c) *Mambi Thu* (AA); d) *Hawaiian-2* (*Musa acuminata*).

122 La variedad Malaccensis (ITC 0074) fue la única que difirió significativamente ($P \leq 0,05$) de las restantes
123 con respecto a su capacidad para formar nuevas plantas a partir de los meristemos crioconservados (Figura
124 2) a pesar de que el 67% de estos fueron evaluados como viables (Tabla 1).

125 **Tabla 1.** Supervivencia y neoformación de plantas a partir de meristemos apicales crioconservados
126 (-196°C) de diferentes variedades del Banco Mundial de Germoplasma de *Musa spp.*

Variedad	Genoma	Meristemos conservados (-196°C) (MC)	Meristemos viables después de crioconservados (Sm)		Neoformación de plantas			
			Cantidad	% Sm	Cantidad	%	Promedio varietal (%)	Promedio Genoma (%)
Type x2 (ITC 0069)	<i>M.ac</i>	26	8	30,7	7	26,92	34,18	34,61
		21	7	33,3	6	28,57		
		17	11	64,7	8	47,05		
Ac.Kluai Hong Det (ITC 0404)	<i>M.ac</i>	12	5	41,6	5	41,60	47,43	
		7	6	85,7	4	57,14		
		24	10	41,6	8	33,3		
		26	21	80,7	15	57,69		
Banksii (ITC 0466)	<i>M.ac</i>	21	9	42,8	6	28,50	30,49	
		29	22	75,8	6	20,68		
		26	11	42,3	11	42,3		
Banksii (ITC 0619)	<i>M.ac</i>	28	13	46,4	13	46,40	30,89	
		26	4	15,4	4	15,38		
Banksii (ITC 0620)	<i>M.ac</i>	30	23	76,6	19	63,33	63,3	
Banksii (ITC 0936)	<i>Mac.</i>	27	18	66,6	4	14,8	19,13	
		21	16	76,1	5	23,8		
		22	18	81,8	4	18,8		
Malaccensis (ITC 0074)	<i>M.ac</i>	31	17	54,8	2	6,45	11,84	
		33	23	69,6	3	9,09		
		30	23	76,6	6	20,00		
Hawaian2 (ITC 0616)	<i>M.ac</i>	24	8	33,1	8	33,3	39,66	
		21	9	42,8	4	19,04		
		30	22	73,3	20	66,66		
Pisang Gui Ninchio (ITC 0975)	AA	28	16	57,14	16	57,14	33,06	
		33	17	51,5	7	21,21		
		24	5	20,8	5	20,83		
Mambí Thu (ITC 0612)	AA	23	10	43,4	10	43,40	26,24	
		11	1	9,09	1	9,09		
Pute la Bum (ITC 0446)	AA	25	8	32,0	2	8,00	12,69	
		23	7	30,4	4	17,39		
IRFA 509 (ITC 1267)	AA	21	10	47,6	10	47,6	34,7	
		18	4	22,2	4	22,2		
Guineo (ITC 0005)	AAA-h	12	5	41,6	5	41,60	37,93	
		6	3	50,0	3	50,00		
		27	6	22,2	6	22,2		
Figue Rose Naine (ITC 1159)	AAA	20	9	45,0	6	30,00	24,09	
		33	26	78,7	6	18,18		
Pelipita (ITC 0095)	ABB	11	2	13,3	2	18,18	50,93	
		13	11	84,6	11	84,61		
		14	7	50,0	7	50,00		

127 El 53,3% de las accesiones evaluadas presentaron un porcentaje de brotes neoformados entre 30 y 63,3%.
128 Aunque esta proporción varió en las diferentes evaluaciones experimentales realizadas, e inclusive entre las
129 distintas accesiones pertenecientes a cada grupo genómico, no se encontraron diferencias significativas
130 ($P \leq 0,05$) al comparar los resultados de estos grupos en ninguno de los análisis estadísticos realizados, lo
131 que permite afirmar que la respuesta al estrés por el frío de las variedades no estuvo relacionada
132 directamente con el grupo genómico al que pertenecen, al menos para los evaluados en nuestro caso.



133
134

135 **Figura 2.** Comparación estadística de la viabilidad de meristemos, luego de su crioconservación y la
136 neo formación en plantas de distintas variedades genoma *Musa acuminata*. Letras distintas
137 difieren para $P \leq 0,05$. (SMt: Supervivencia de meristemos crioconservados; PFt: neo
138 formación de plantas).

139 Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados previamente por Panis et al (Panis,
140 et al, 2004) para las accesiones pertenecientes a los grupos genómicos AAA y ABB. Sin embargo, nuestro
141 laboratorio logró cifras ligeramente superiores en cuanto a la formación de nuevas plantas en variedades
142 pertenecientes a los grupos AA y AAA-h.

143 Conclusiones

- 144** 1. Se regeneraron plantas de 15 variedades de *Musa* spp, pertenecientes a cinco grupos genómicos
145 diferentes, a partir de los meristemos apicales crioconservados en nitrógeno líquido.
- 146** 2. Las variaciones en la sobrevivencia de meristemos crioconservados y su neoformación en brotes
147 responden a las características individuales de las variedades en respuesta al estrés por el frío y no
148 pueden asociarse a un comportamiento diferencial de los grupos genómicos.

149 Bibliografía

150

151 Frison, E.A. and Sharrock S. (1999). The economic, social and nutritional importance of banana in
152 the World. In: Pick.C, Foure E, Frison EA (Eds) Banana and food security. INIBAP, Montpellier,
153 France, pp 21 -35.

154 Korneva S. y Maribona R.H. (1988) .ONITEM, Oficina de Patentes, RPI 96/88, La Habana, Cuba.

155 Murashige, T. & Scoog F. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco
156 tissue cultures. *Physiol Plant*15:473 -497.

157 Panis B., Thinh, NT., Escalant, J-V. & Sharrock S. (2001). Guías Técnicas INIBAP n.5.

158 Crioconservacion de Germoplasma de Musa. p.34.

159 Panis B., Strosse H., Van den Hende S., and Swennen R. (2002). Sucrose preculture to simplify
160 criopreservación of banana meristemos cultures. *Cryoletters*: 23: 375-384.

161 Panis B., Piette B.,and Swennen.R. (2004). Droplet vitrificación of apical meristems:a
162 criopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science*, accepted 14 July 2004.