

**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](mailto:skorneva@espol.edu.ec) ; [www.cibe.espol.edu.ec](http://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.

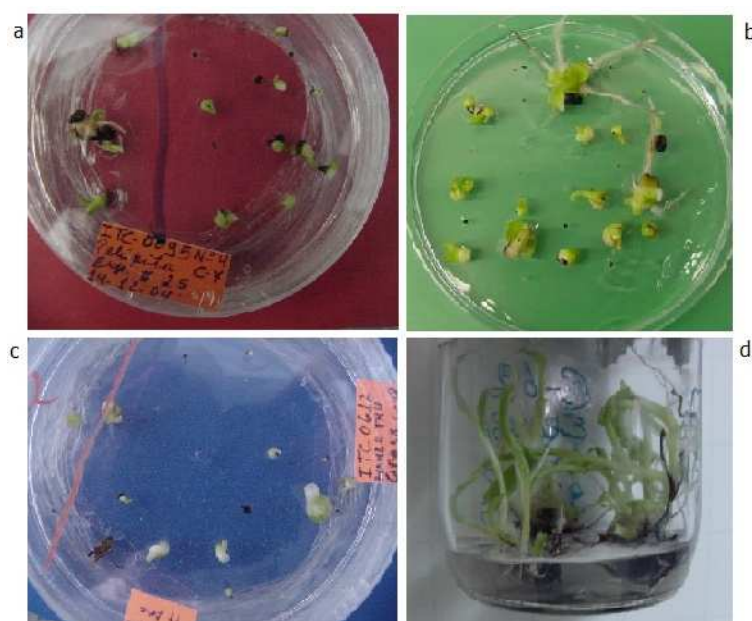
**99** Veinticuatro horas después de siembra de los meristemos descongelados en el medio de cultivo en  
**100** presencia de 0.3M de sacarosa, se observó fenolización alrededor de algunos explantes debido a la  
**101** reacción enzimática del material sobreviviente con el medio de cultivo.

**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.



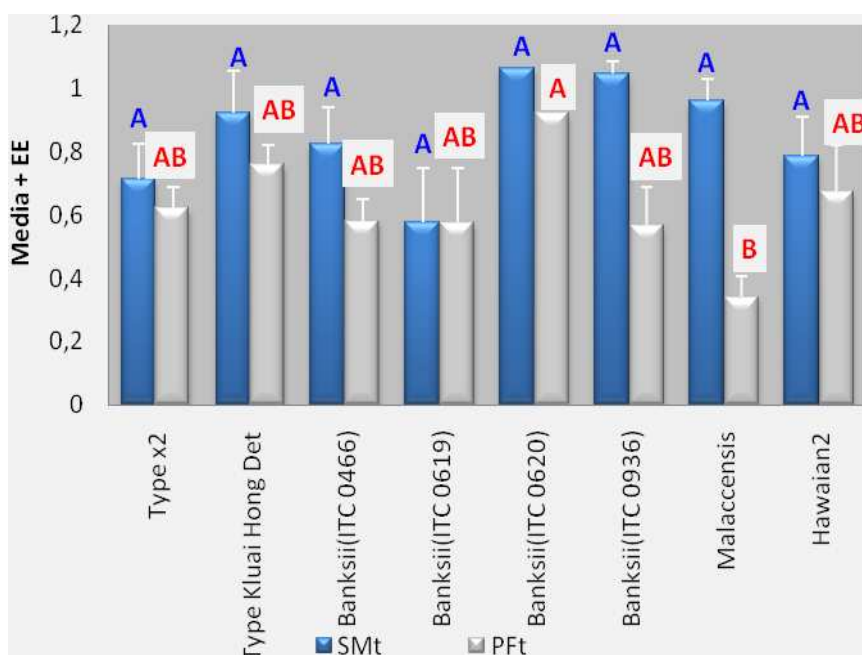
**118**  
**119** **Figura 1.** Brotes neoformados luego de la crioconservación (-196°C) de meristemos apicales de diferentes  
**120** variedades de *Musa spp.*, pertenecientes a diferentes grupos genómicos: a) variedad *Pelipita* (ABB);  
**121** b) *Musa acuminata* tipo *Kluai Hong Det*; c) *Mambi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