

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSTGRADO

RECIBIDO
8 DIC 1998

**CRIOCONSERVACION DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGENICAS
DE *Musa* spp. INICIADAS A PARTIR DE FLORES INMADURAS**

POR

EMELDA VERONICA YAH CORREA



CENTRO AGRONÓMICO DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA
AREA DE POSTGRADO

RECIBIDO

CRIOCONSERVACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS
DE *Musa* spp. INICIADAS A PARTIR DE FLORES INMADURAS.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico de Postgrado y Capacitación del Programa de Enseñanza en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

Magister Scientiae

Por

EMELDA VERONICA YAH CORREA

CATIE

Turrialba, Costa Rica

1998

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

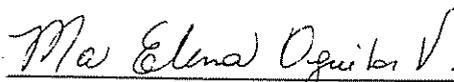
FIRMANTES:



Francois Cote
Profesor Consejero

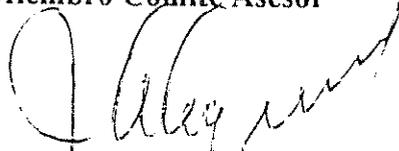


Ana Abdelnour
Miembro Comité Asesor



María Elena Aguilar
Miembro Comité Asesor

Miembro Comité Asesor



Juan A. Aguirre
Director y Decano de la Escuela de Postgrado



Emelda Yah
Candidato

A Dios por su amor infinito y misericordia

A mis padres por el apoyo que me brindan siempre

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a:

A la Escuela de Postgrado de CATIE, en especial al Dr. Juan Aguirre, por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios.

A la Embajada de Holanda por el financiamiento de mis estudios de Postgrado.

A la Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda (EARTH), a la Fundación Kellogg y al Gobierno de Belice por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Licenciatura en Ciencias Agronómicas.

A Agnès Grapin Ph. D. por sus enseñanzas y apoyo al inicio de la realización de este trabajo

A François Côte Ph. D. por sus valiosos aportes en el desarrollo de esta investigación.

A María Elena Aguilar Ph. D. por su amistad brindada, orientación y revisión del documento.

A Ana Abdelnour M. Sc. por su colaboración y participación como miembro del comité asesor.

A Nelly Vásquez M. Sc. por su amistad brindada y por sus sugerencias en la realización de este trabajo.

Al personal de la Unidad de Biotecnología del CATIE, por su colaboración en el desarrollo de esta investigación, especialmente a Juan Luis Ortiz y a Guillermo Hidalgo.

Con mucho cariño a mis amigos Simón Vásquez, Ivette Girón y a Juana Pérez, que en estos dos años compartimos muchas alegrías, dificultades y tristezas.

CONTENIDO

Resumen.....	x
Summary.....	xi
Lista de figuras.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	3
2. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1. Presentación de la planta.....	5
2.1.1. Taxonomía y clasificación.....	5
2.1.2. Botánica.....	5
2.2. Embriogénesis Somática.....	6
2.2.1. Totipotencia Vegetal.....	6
2.2.2. Definición de la embriogénesis somática.....	6
2.2.3. Suspensiones celulares embriogénicas.....	7
2.3. Crioconservación.....	8
2.3.1. Selección del material.....	8
2.3.2. Precultivo.....	9
2.3.3. Pretratamiento.....	9
2.3.4. Congelamiento.....	10
2.3.4.1. Congelamiento rápido.....	10
2.3.4.2. Congelamiento lento.....	11
2.3.4.3. Congelamiento escalonado.....	12
2.3.5. Almacenamiento.....	12
2.3.6. Descongelación.....	13
2.3.7. Post tratamiento.....	13
2.4. Evaluación de los resultados.....	14

2.5. Crioconservación del germoplasma de <i>Musa</i>	15
2.5.1. Crioconservación de embriones cigóticos.....	15
2.5.2. Crioconservación de embriones somáticos.....	16
2.5.3. Crioconservación de callos.....	16
2.5.4. Crioconservación de meristemos <i>In vitro</i>	16
2.5.5. Crioconservación de suspensiones celulares	17
3. MATERIALES Y METODOS	18
3.1. Localización del ensayo.....	18
3.2. Material.....	18
3.2.1 Material vegetal.....	18
3.3. Metodología	18
3.3.1. Cultivo <i>in vitro</i>	18
3.3.2. Crioconservación	19
3.3.2.1. Efecto del precultivo.....	19
3.3.2.2. Crioprotección o pretratamiento.....	20
3.3.2.3. Congelamiento.....	20
3.3.2.4. Descongelamiento	20
3.3.2.5. Recuperación de las células crioconservadas.....	20
3.3.2.6 Determinación de la viabilidad.....	21
3.3.2.7. Crioconservación de varios genotipos de <i>Musa</i>	21
3.3.2.8. Expresión de los resultados.....	22
3.3.4. Estudios histológicos.....	22
3.3.5. Análisis estadístico.....	23

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de varios protocolos de criopreservación sobre la regeneración de suspensiones celulares de <i>Musa</i> spp.....	24
4.1.1. Crecimiento de la suspensión celular después de la criopreservación.....	24
4.1.2. Formación de embriones a partir de suspensiones celulares criopreservadas.....	27
4.1.3. Germinación de embriones provenientes de suspensiones celulares criopreservadas.....	34
4.1.4. Eficiencia de la formación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas en los tratamientos estudiados.....	36
4.2. Características de la regeneración relacionadas con la eficiencia de la criopreservación.....	37
4.2.1. Eficiencia de la formación de embriones con el incremento relativo del volumen celular y el porcentaje de germinación.....	37
4.2.2. Características histológicas de las suspensiones celulares testigos de los cultivares utilizados.....	40
4.2.2.1. Dominico '1' (AAB).....	40
4.2.2.2. Gros Michel '3' (AAA).....	40
4.2.2.3. Curraré '3' (AAB).....	40
4.2.2.4. SF '265' (AA).....	41
4.2.2.5. Col '49 2.8' (AA).....	41
4.2.3. Características histológicas de las suspensiones celulares, 48 horas después de la descongelación.....	41
4.3. Viabilidad de la suspensión celular antes y después de la criopreservación. ¿Es un indicador para medir la eficiencia de criopreservación?.....	45
4.3.1. La influencia de la calidad de la suspensión celular y la capacidad a ser criopreservada.....	45

4.3.2. Utilización de la prueba de diacetato de fluoresceína (FDA) para determinar la capacidad de recuperación de suspensiones celulares criopreservadas.....	48
5. DISCUSIÓN	
5.1. Efecto de varios protocolos de criopreservación sobre la regeneración de suspensiones celulares de <i>Musa</i> spp. cv. Dominico.....	50
5.1.1. Efecto de la influencia de la inducción de la cristalización, el pretratamiento, el modo de recuperación del material criopreservado y el precultivo.....	50
5.1.2 Aplicación del protocolo modificado a varios genotipos de <i>Musa</i> spp.....	53
5.2. Características de las etapas de la regeneración relacionada con la eficiencia de la criopreservación.....	55
5.3. Determinación de la viabilidad de la suspensión celular antes y después de la criopreservación. ¿Es un indicador para medir la eficiencia de la criopreservación...?	62
6. CONCLUSIONES	58
7. RECOMENDACIONES	60
8. LITERATURA CITADA	61
9. ANEXOS	70

YAH, E.V. 1998. Crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp. iniciadas a partir de flores inmaduras. Tesis Mag. Sci. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 79p.

Palabras claves: *Musa* spp. suspensiones celulares, cultivares, crioconservación, diacetato de fluoresceína (FDA), inducción de la cristalización, crioprotección, precultivo descongelaación y eficiencia.

RESUMEN

Las suspensiones celulares constituyen una técnica muy valiosa para el mejoramiento genético de *Musa* spp. como fuente de material para la transformación genética, la hibridación somática a partir de la fusión de protoplastos y la propagación masiva. La crioconservación ofrece a su vez alternativas muy promisorias para la conservación y manejo de estas suspensiones.

En el presente trabajo se optimizó el protocolo existente para la crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp. iniciadas a partir de flores inmaduras. Se realizó cuatro experimentos de forma independiente utilizando suspensiones celulares de cv. Dominico (*Musa* AAB). En cada experimento se modificó una de las etapas de crioconservación: inducción de la cristalización, condiciones del pretratamiento (diferentes niveles de sacarosa 0.13, 0.26, 0.39, 0.53 M), recuperación celular (medio sólido o líquido) y tratamiento de precultivo con sacarosa o lactosa.

Los resultados obtenidos demuestran que la inducción de la cristalización es indispensable para la recuperación de las células después de la descongelaación. La concentración óptima de sacarosa durante el pretratamiento de 90 g.l (0.26M) y 135 g.l (0.39M). La recuperación celular fue más eficiente en medio sólido con un plateo de alta densidad. El precultivo de las suspensiones celulares fue las efectivo con presencia de sacarosa (0.39M) por 7 días.

El protocolo optimizado fue aplicado a diferentes suspensiones celulares embriogénicas de *Musa*, y cuatro de cinco cultivares resistieron la congelaación (Dominico, 'SF265', Curraré

'3' y Col '49 2.8').

Dado que no existe un método estándar para cuantificar la eficiencia de un protocolo de crioconservación, se trató de buscar “indicadores” que pudieran relacionar la calidad de la suspensión celular a ser crioconservada. La eficiencia fue calculada relacionando el número de embriones obtenidos de suspensiones celulares crioconservadas con el número de embriones del testigo (no crioconservados).

Los resultados obtenidos demuestran que la eficiencia del protocolo aplicado varió en un rango de 0 a 26%. Las características de las diferentes etapas de regeneración que relacionados a la eficiencia de la crioconservación son: el incremento del volumen celular y el porcentaje de germinación. La prueba de viabilidad celular con diacetato de fluoresceína (FDA) fue un buen indicador para determinar la eficiencia de esta metodología, realizada 48 horas después de la descongelación.

YAH, E.Y. 1998. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of *Musa* spp. initiated from immature flowers. Thesis Mag. Sci. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 79 p.

Key words: *Musa* spp., cellular suspensions, cultivars, cryopreservation, fluorescein diacetate (FDA), crystallization induction, crioprotection, pregrowth, thawing and efficiency.

SUMMARY

Suspension cultures constitutes a valuable technique for the improvement of *Musa* spp. as a source of material for genetic transformation, somatic hybridization by protoplast fusion and massive propagation. Cryopreservation offers a promising alternative for the conservation and management of these suspensions.

In the present work, an existent protocol of cryopreservation was optimized for its efficiency in embryogenic cell suspensions of *Musa* spp., initiated from immature flowers. Four experiments were realized independently using cellular suspensions of cv. Dominico (*Musa* AAB). In each experiment, one of the process of the protocol was modified: crystallization induction, pretreatment conditions (enriched with different levels of sucrose 0.13, 0.26, 0.39 0.53 M), cellular recuperation (solid or liquid medium) and pregrowth treatment with sucrose and lactose.

The results indicated that crystallization induction during freezing is indispensable for cellular recuperation after thawing. The optimal sucrose concentration during pretreatment were 90 g/l (0.39M) and 135 g/l (0.53M). Cellular recuperation was more efficient on solid medium plated at high density than at low ones. Pregrowth of cell suspension with sucrose (0.39M) for 7 days was the most efficient .

The optimized protocol was applied in embryogenic cell suspensions of *Musa* and four out of five cultivares withstood cryopreservation (Dominico, SF '265', Curraré '3' and Col '49 2.8').

Since there is not a standard method to quantify efficiency of any cryopreservation protocol, we tried to find “indicators” that may relate the quality of the cellular suspensions with their aptitude for cryopreservation. Efficiency was calculated relating the number of embryos produced from cryopreserved cell suspensions with the number of embryos produced on the control (non cryopreserved cell suspension).

The results obtained showed that the efficiency of the modified protocol varied from 0-26%. The characteristics of the different stages of regeneration that related the efficiency of the protocol were cellular volume increment and the percentage of germination. Viability test with fluorescein diacetate (FDA) was a good indicator for the assessment of the efficiency of this protocol, when realized 48 hours after thawing.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Páginas
Fig. 1. Incremento del volúmen celular de suspensiones celulares criopreservadas 30 días después de la descongelación en los cinco ensayos realizados. (La significancia estadística representada por letras se evaluó al 0.01. Para cada tratamiento, se utilizó tres repeticiones).....	25
Fig. 2. Suspensión celular de Dominico '1' reiniciada a partir de células criopreservadas a) no criopreservada, b) criopreservada.....	27
Fig. 3. Número de embriones formados a partir de suspensiones celulares criopreservadas para los cinco ensayos estudiados. (La significancia estadística representada por letras se evaluó al 0.0. Ver descripción de los tratamientos en anexo 2.....	28
Fig. 4. Formación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas de Dominico '1'. a) con inducción de la cristalización, b) sin inducción de la cristalización.....	29
Fig. 5. Formación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas del cv. Dominico (<i>Musa</i>) las cuales fueron pretratadas con diferentes concentraciones de sacarosa. a) 45 g/l, b) 90 g/l, c) 135 g/l, d) 180 /l de sacarosa.....	30
Fig.6. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de Dominico '1'. Once semanas después de la descongelación. a) testigo, b) criopreservado.....	31
Fig 7. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de Col '49 2.8'. a) testigo, b) criopreservado.....	32

Fig. 8. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de Gros Michel '3'. a) testigo, b) criopreservado.....	32
Fig. 9. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de Curraré '3'. a)testigo, b) criopreservado.....	33
Fig. 10. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de SF '265'. a)testigo, b) criopreservado.....	33
Fig.11. Porcentaje de germinación del ensayo 1, 3 y 5. (La significancia estadística representada por letras se evaluó al 0.01. Ver descripción de los tratamientos en anexo 2.	34
Fig. 12. Germinación de embriones provenientes de suspensiones celulares criopreservadas a) testigo, b) sin inducción de la cristalización, c) con inducción de la cristalización.....	35
Fig. 13. Eficiencia de la formación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas en los tratamientos estudiados. Ver descripción de los tratamientos en anexo 2.....	36
Fig. 14. Relación de la eficiencia de la formación de embriones y el incremento del volumen celular. Los números corresponden a los tratamientos analizados. Ver descripción de los números en anexo 2.....	38
Fig. 15. Relación entre el porcentaje de germinación y la eficiencia de la formación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas. Ver descripción de los números en anexo 2.....	38

- Fig. 16. Relación entre el porcentaje de germinación y el número de embriones del testigo (no criopreservado). Los números corresponden a los tratamientos analizados. Ver descripción de los números en anexo 2.....39
- Fig. 17. Suspensión celular embriogénica de Dominico '1' Testigo (X 20) *A*: agregados, *V*: vacuolas, *N*: núcleo, *Al*: almidón, *d*: división celular. b) Suspensión celular criopreservada de Dominico '1' (X20). *C*: citoplasma, *P*: plasmólisis.....42
- Fig.18. Suspensión celular embriogénica de Gros Michel '3' Testigo (X 20) *A*: agregados, *V*: vacuolas, *N*: núcleo, *Al*: almidón, *d*: división celular. b) Suspensión celular criopreservada de Gros Michel '3' (X 20). *P*: plasmólisis.....42
- Fig. 19. Suspensión celular embriogénica de Curraré '3' Testigo (X 10) *A*: agregados, *V*: vacuolas, *Al*: almidón. b) Suspensión celular criopreservada de Curraré '3' (X 20). *P*: plasmólisis.....43
- Fig. 20. Suspensión celular embriogénica de SF '265' (X 20) *N*: núcleo, *V*: vacuolas. b) Suspensión celular criopreservada de SF '265' (X 20). *P*: plasmólisis.....43
- Fig. 21. Suspensión celular embriogénica de Col '49 2.8' (X 10) *PE*: proembriones. b) Suspensión celular criopreservada de Col '49 2.8' (X 20). *P*: plasmólisis.....44
- Fig. 22. Relación entre la eficiencia de la formación de embriones a partir de suspensiones celulares criopreservadas de *Musa* spp. y la viabilidad de la misma antes de la criopreservación. Ver descripción de los números en anexo 2.....45
- Fig. 23. Relación entre el número de embriones formados a partir de suspensiones celulares criopreservadas y la viabilidad del mismo (no criopreservado) del cv. Dominico (*Musa* spp.) Ver descripción de los números en anexo 2.46

Fig. 24. Relación entre el número de embriones formados a partir de suspensiones celulares testigos (no crioconservados) del cv. Dominico (<i>Musa spp.</i>) y la viabilidad del mismo. Ver descripción de los números en anexo 2.	47
Fig. 25. Relación entre la eficiencia de la formación de embriones a partir de suspensiones celulares del cv. Dominico (<i>Musa spp.</i>) y la viabilidad del mismo después de la descongelación. Ver descripción de los números en anexo 2.	48
Fig. 26. Relación entre el incremento del volumen celular y la viabilidad de las suspensiones celulares de <i>Musa spp.</i> después de la descongelación. Ver descripción de los números en anexo 2.	49

Anexos

Anexo 1. Tabla de referencia para determinar la viabilidad de las suspensiones celulares con FDA.....	70
Anexo 2. Descripción de los ensayos de crioconservación de suspensiones celulares de <i>Musa spp.</i> , CATIE, 1998.....	71
Anexo 3. Gráfica representando las corridas de los programas de congelamiento. a) con inducción de la cristalización, b) sin inducción de la cristalización	72
Anexo 4. Análisis estadístico utilizado para la crioconservación de suspensiones celulares de <i>Musa spp.</i>	73
Anexo 5. Representación esquematizada del protocolo base de Panis <i>et al.</i> (1990).....	78
Anexo 6. Representación esquematizada de las modificaciones del protocolo base de Panis <i>et al.</i> (1990).....	79

1. INTRODUCCIÓN

La erosión genética causada por la destrucción de los hábitats, por la selección natural, y los agentes bióticos ha incrementado en los últimos años el interés por la conservación del germoplasma vegetal (Hawkes, 1981). El género *Musa* no es la excepción y poco a poco representaciones de plátano y banano desaparecen debido a los desastres naturales, la agricultura nómada y la deforestación (Sandoval y Muller, 1989). La conservación de la variabilidad de *Musa* es de importancia fundamental para asegurar una base genética amplia y diversa que asegure la existencia de fuentes potenciales de materiales para los trabajos en fitomejoramiento.

La forma más conveniente de conservar el germoplasma vegetal es mediante el almacenamiento de semillas, sin embargo, no siempre es posible hacerlo en plantas con semillas recalcitrantes o de reproducción vegetativa como los bananos y plátanos (Panis *et al.* 1990; Villalobos y Abdelnour, 1992). Por tal razón, se han desarrollado métodos alternativos de conservación de estas especies. Las colecciones de campo son una opción, sin embargo, el costo de mantener una gran cantidad de genotipos en el campo es sumamente alto y además, existe el riesgo de pérdida de los materiales por diferentes factores biológicos y ambientales (Ochoa, 1985).

Los métodos de cultivo *in vitro* a partir de células, tejidos u órganos han conducido a la utilización de diferentes técnicas para la preservación de germoplasma. Sin embargo, el almacenamiento *in vitro* de grandes cantidades de material vegetal requiere de subcultivos regulares, y tiene altos riesgos de contaminación y de variación genética (Engelmann, 1991).

El almacenamiento de tejidos vegetales por periodos indefinidos con garantía de su estabilidad genética, se logra mediante la crioconservación (Withers y Street, 1977). Esta modalidad de almacenamiento tiene además, las ventajas de que los costos de mantenimiento, de labor y de espacio se reducen al máximo (Villalobos y Abdelnour, 1992).

Las técnicas de criopreservación han sido utilizadas en muchas especies vegetales, incluyendo a las especies tropicales (Engelmann, 1991): son aplicables a meristemos (Kantha *et al.* 1982), embriones somáticos y embriones cigóticos (Engelmann *et al.* 1985), (Prado, 1991), suspensiones celulares (Aguilar *et al.* 1993; Rajasekaran, K. 1996) y protoplastos (Langis y Steponkus, 1990). Sin embargo, el problema que presenta esta técnica es el bajo porcentaje de viabilidad del material criopreservado. Por lo cual se hace necesario realizar estudios técnicos para seleccionar el tipo de material a utilizar, determinar los efectos de los crioprotectores y obtener una metodología de la tasa de congelamiento y descongelamiento que sea exitosa para la recuperación posterior del material utilizado.

En *Musa*, se ha logrado la criopreservación de suspensiones celulares del genotipo ABB para lo cual se utilizó el congelamiento lento y 5% DMSO como crioprotector (Panis *et al.* 1990). Abdelnour *et al.* (1992), reportaron el éxito de la criopreservación de embriones cigóticos en *M. acuminata* y *M. balbisiana* mediante la técnica de deshidratación y congelación rápida. Prado (1991), criopreservó callos de Gran Enano y callos embriogénicos de *Musa acuminata* spp. Malaccensis.

La criopreservación tiene un desarrollo reciente en el género *Musa*, sin embargo, ésta ofrece un alto potencial y tiene grandes implicaciones en la conservación y en el intercambio de germoplasma de esta especie (Bajaj, 1983).

El manejo del germoplasma de banano y plátano constituye una tarea de carácter internacional, tanto para la Red Internacional de Mejoramiento del Banano y el Plátano (INIBAP) (Sharrok, 1989) como para el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), quienes se fusionaron en 1994 (INIBAP, 1996).

La criopreservación de las suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* permite lograr varios objetivos: conservar los recursos genéticos, optimizar el manejo de las suspensiones celulares, facilitar el uso de material vegetal conservado para que pueda ser utilizable para la fusión de protoplastos y la transformación genética.

El estudio de la crioconservación de suspensiones celulares del género *Musa* permitió apoyar los esfuerzos que realiza el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en materia de investigación y promoción de la conservación de los recursos genéticos. Por ejemplo, el CATIE dentro de un proyecto INCO financiado por la Comunidad Europea tiene la función de producir suspensiones celulares de genotipos diploides los cuales servirán como fuente de protoplastos para los estudios en hibridación somática. Razon por la cual, el desarrollo de la crioconservación en el laboratorio del CATIE, favorecerá el manejo de las suspensiones celulares embriogénicas de *Musa*.

1.1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo general del estudio es de mejorar el protocolo de crioconservación existente en suspensiones celulares embriogénicas de *Musa*, iniciadas a partir de flores inmaduras. Para la cual, se modificó algunas de las etapas significativas del protocolo desarrollado por Panis *et al.* (1990). Se plantearon tres preguntas:

¿Será que es posible mejorar la eficiencia de la crioconservación modificando alguna etapa de un protocolo existente de crioconservación?

¿ Cuales son las características de las diferentes etapas de la regeneración celular que se relacionan con la cuantificación de la eficiencia de la crioconservación?

¿Será que la prueba de viabilidad (FDA) puede ser un indicador para determinar la capacidad de la suspensión a ser crioconservada?

Objetivos específicos:

-Verificar la influencia positiva de la inducción de la cristalización en la calidad de la suspensión celular después de la crioconservación.

- Analizar el efecto crioprotectante de la mezcla de dos sustancias utilizadas durante el pretratamiento.
- Determinar el efecto del precultivo en la tolerancia de la suspensión celular a la crioconservación.
- Analizar el efecto del medio líquido en la recuperación de las células crioconservadas con respecto al uso de medio sólido. Esto con el fin de eliminar la fase de recuperación en medio sólido.
- Verificar la eficiencia de este protocolo de crioconservación en varios genotipos de *Musa*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Presentación de la planta

2.1.1. Taxonomía y Clasificación

Las Musáceas pertenecen al orden Zingiberales. Esta familia está constituida por dos géneros: *Musa* y *Ensete* (Soto, 1990). El género *Musa* se divide en cuatro secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys, y Eumusa. La mayoría de los bananos comestibles de la sección Eumusa tienen su origen en solamente dos especies silvestres: *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (Stover y Simmonds, 1989). Las formas silvestres son diploides y fértiles, mientras que los genotipos cultivados son todos partenocarpicos y estériles, condiciones indispensables para obtener frutas comestibles. La esterilidad se debe a un complejo de causas: genes específicos de esterilidad femenina, la poliploidía, y el cambio estructural cromosómico (Soto, 1990).

Los elementos principales en la clasificación de los bananos comestibles son aquellos referidos al origen biespecífico y al conocimiento del número de cromosomas. De acuerdo con esto, se han identificado nueve grupos de cultivares con diferentes niveles de ploidía y diversos aportes en el genoma ($A = acuminata$ y $B = balbisiana$) desde los diploides ($2n=2x=22$) hasta los tetraploides ($2n=4x=44$). Los triploides son comúnmente los más numerosos, los diplóides y están en número intermedio y los tetraploides son muy raros (Stover y Simmond, 1989). La triploidía confiere un mayor vigor a la planta, una mayor productividad y favorece la esterilidad.

2.1.2. Botánica del género *Musa*

Los bananos y plátanos son plantas herbáceas, con un pseudotallo compuesto de vainas foliares, originadas de cromos en los que se desarrollan las yemas laterales. Las hojas nacen en espiral, las primeras son escamosas, seguidas de hojas angostas. La inflorescencia es terminal y crece por el centro del pseudotallo, hasta alcanzar el follaje donde emerge. La

inflorescencia es una espiga compleja la cual consiste de un pedúnculo en el que las flores están distribuidas en racimos nodales (Soto, 1990).

2.2. Embriogénesis Somática

2.2.1. Totipotencia vegetal

El principio de Haberlandt (1902), indica que cada célula vegetal, cualquiera que sea su especialización, si está viva y posee un núcleo, tiene la capacidad de producir una planta entera. Es decir, la totipotencia significa que cada célula vegetal mantiene la capacidad de expresar todo el potencial genético de la planta madre. Este principio se basa en los fenómenos de la diferenciación y de la dediferenciación celular. La dediferenciación es el fenómeno del paso de una célula especializada a una célula no diferenciada de tipo meristemático o embriogénico.

2.2.2. Definición de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática y zigótica presentan procesos ontogénicos idénticos o muy similares desde el estado globular hasta la conversión de plantas completas sin la fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986) Como embriones somáticos o adventicios se han identificado los iniciados a partir de células que son el producto de la fusión de gametos (Litz y Jarret 1991). Las características que permiten reconocer un embrión somático son la estructura bipolar (meristemo caulinar y el meristemo radical), y la formación de una marcada epidermis (Rangaswamy, 1986).

El proceso de la embriogénesis somática tiene diferentes etapas: 1) inducción de la embriogénesis somática, 2) proliferación del callo embriogénico, 3) expresión de la embriogénesis o formación de los embriones somáticos y 4) la maduración y germinación de los embriones (Lyndsey y Topping 1993).

La proliferación del callo es posible en medio sólido o en medio líquido. Sin embargo, el segundo es el más interesante ya que permite establecer una suspensión embriogénica que, la cual se puede mantener durante varios meses. Además permite homogeneizar el desarrollo del material para obtener un crecimiento sincronizado de los embriones y plantas regeneradas

2.2.3. Suspensiones celulares embriogénicas

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento. Estas suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrimentos. La caracterización del crecimiento de las suspensiones celulares se realiza considerando los siguientes parámetros: número de células, actividad mitótica, fresco (fresco y seco), turbidez y volumen (Szabados *et al.* 1991).

La embriogénesis somática en *Musa*, utilizando la suspensiones celulares embriogénicas, ha sido materia de investigación desde 1960 (Novak, 1992). Se han desarrollado cuatro métodos principales dependiendo de los diferentes explantes utilizados. Novak *et al.* (1989), utilizaron las láminas foliares o fragmentos de rizomas de plantas producidos *in vitro*. Dhed'a *et al.* (1991), iniciaron el establecimiento de las suspensiones celulares con secciones pequeñas de yemas que se encontraban en proliferación sobre un medio líquido. Marroquin *et al.* (1993), establecieron suspensiones embriogénicas de embriones cigóticos inmaduros; en este caso, la naturaleza del explante se limita a aquellas especies que producen semillas. Ma (1991), utilizó flores masculinas para iniciar el cultivo de suspensiones. Escalant *et al.* (1994), obtuvieron tejidos embriogénicos a partir del cultivo de flores masculinas. Ellos lograron la proliferación de embriones adventicios en medio líquido pero no el desarrolló de suspensiones celulares embriogénicas. Mientras que Côte *et al.* (1996) y Grapin *et al.* (1996), establecieron suspensiones celulares embriogénicas con flores masculinas. Recientemente, Grapin *et al.* (1998), establecieron suspensiones celulares de flores femeninas.

2.3. Crioconservación

La técnica de crioconservación consiste en suprimir totalmente el metabolismo y el crecimiento del material vegetal mediante su almacenamiento a temperaturas ultra bajas (196°C). A estas temperaturas el metabolismo del material vegetal cesa y no ocurre división celular y deterioro, por lo tanto, los materiales se conservan bajo condiciones de alta estabilidad genética por tiempo indefinido (Ashwood- Smith y Friedmann, 1979). Este método se considera ideal para la conservación a largo plazo ya que disminuye los riesgos de pérdida, requiere un mínimo de labor y los costos de mantenimiento se reducen considerablemente (Villalobos y Engelmann, 1995)

Para lograr una exitosa crioconservación es necesario acondicionar los especímenes para que puedan sobrevivir al proceso de congelamiento, por lo tanto, el proceso de crioconservación comprende varias etapas de tratamientos cuidadosamente aplicados. Estas etapas son: la selección del material, el precultivo (etapa opcional), el pretratamiento, la congelación, la descongelación, y los tratamientos posteriores (Engelmann, 1991).

2.3.1. Selección del material

Como regla general, el material seleccionado debe ser joven y meristemático. Para la crioconservación de suspensiones celulares, se recomienda el uso de material durante la fase exponencial ya que las células en esta etapa pueden soportar el congelamiento (Withers, 1985). Sugawara y Sakai (1974), encontraron que la mejor etapa para la crioconservación de suspensiones celulares es aquella en donde las células se encuentran en sus primeras fases de división ya que en ese momento las células tienen un citoplasma denso y una alta capacidad de sobrevivencia. Las células capaces de soportar la congelación se caracterizan por ser pequeñas, contiene pocas vacuolas, es decir, tener baja cantidad de agua, con citoplasma denso, y una amplia relación nucleo-citoplasma (Engelmann, 1991).

2.3.2. Precultivo

El precultivo es una etapa preliminar que puede preparar el material para que resista mejor al pretratamiento y por consiguiente a la crioconservación. El período de duración puede ser desde algunos días hasta 1-2 meses. Es importante que los compuestos a utilizar aumenten la presión osmótica de las células pero que sean poco o no tóxicos. Esta práctica no es utilizada en todos los casos, sin embargo, ha sido empleada con éxito para la crioconservación de suspensiones celulares de maíz (*Zea mays*). En este caso, el precultivo tuvo una duración de 3-4 días en un medio con 5 o 10% de prolina (Withers y King 1979).

2.3.3. Pretratamiento

El pretratamiento difiere del precultivo ya que se somete el material por un período menor bajo ciertas condiciones para preparar al proceso de la congelación. Esto se lleva a cabo utilizando varias sustancias crioprotectantes como sacarosa, sorbitol, manitol, metilo de disulfóxido (DMSO), polietilenglicol, sorbitol, las cuales difieren grandemente entre sí por el peso molecular, y su estructura. El mecanismo de acción de estas sustancias no es claro, sin embargo, se sabe que cumplen diferentes funciones: a nivel osmótico ayudan en la deshidratación celular, en la protección de las membranas, evitan la formación de grandes cristales de hielo las cuales pueden causar daños durante el congelamiento y el descongelamiento, aumentan la concentración interna de solutos, permiten la formación de puentes de hidrógeno con los fosfolípidos de las membranas ayudando a mantener la estabilidad y protegiendo los sitios de enlace de las enzimas. Para cada especie se debe elegir el crioprotectante a utilizar, la concentración, y la duración del pretratamiento (Engelmann, 1991).

En la crioconservación de suspensiones celulares de *Musa* (ABB) Panis *et al.* (1990), utilizaron combinaciones de diferentes concentraciones de DMSO, (7.5, 10 o 15%) glicerol (5, 10 o 15%), prolina (10%) y una mezcla de 0.5M de DMSO, 0.5M de glicerol y 1M de sacarosa. Estos autores determinaron que el tratamiento crioprotector más efectivo fue el 5% de DMSO.

En suspensiones celulares de cítricos (*Citrus deliciosa* tan.), Aguilar *et al.* (1993) evaluaron los efectos de la combinación de varias concentraciones de sacarosa (0.15 a 0.9 M) con el DMSO (0 a 25 %), las células fueron pretratadas durante una hora. La sobrevivencia máxima se obtuvo con la combinación de 0.15M de sacarosa y 5% de DMSO.

Dussert *et al.* (1991), lograron un 60% de sobrevivencia de células de uva (*Vitis* spp.) pretratadas con 0.25 M de maltosa y 5% de DMSO.

Sugawara y Sakai (1974), confirmaron que se puede lograr alta sobrevivencia de células de *Acer pseudoplatanus* utilizando como crioprotectante una mezcla de DMSO al 24% (v/v) y glucosa al 10% (w/v).

Rajasekaran (1996), obtuvo un 70% de sobrevivencia de suspensiones celulares de algodón (*Gossypium hirsutum* L.). El utilizó una mezcla de sacarosa (5% w/v), DMSO (5%v/v) y glicerol (5%v/v) como solución crioprotectora.

2.3.4. Congelamiento

Los diferentes procesos del congelamiento que pueden ser llevados acabo son: la congelación lenta, congelación rápida y la congelación escalonada (Mroginski *et al.* 1991).

2.3.4.1. Congelamiento rápido

El material vegetal se coloca directamente en nitrógeno líquido. La velocidad de disminución de la temperatura puede ser hasta de 1000°C/min. Es importante que el explante se encuentre en un estado de deshidratación óptimo de manera que se evite la formación de cristales de hielo intracelular los cuales pueden ser dañinos. Este efecto se evita empleando sustancias crioprotectoras adecuadas y procurando que el congelamiento se produzca tan rápidamente como sea posible (a mayor velocidad de congelamiento, menor tamaño de cristales de hielo). También es conveniente emplear un volúmen pequeño de material vegetal cuyo contenido de agua sea bajo (Mroginski *et al.* 1991).

Embriones cigóticos de *M. acuminata* (AA) y *M. balbisiana* (BB) se crioconservaron utilizando el método de congelamiento rápido (Abdelnour *et al.* 1992).

2.3.4.2. Congelamiento lento

En esta técnica el material se congela de forma gradual, se utiliza tasas de disminución de la temperatura que oscilan entre 0.1 y 3°C/min. Este procedimiento permite una deshidratación celular protectora, de manera que los cristales de hielo se forma en el medio extracelular (Withers y Engelmann. 1998). Sin embargo, es conveniente insistir en que la deshidratación excesiva de las células conduce a una alta concentración interna de solutos. Generalmente, el material se congela de forma lenta, a una velocidad adecuada, hasta que alcance una temperatura optima que usualmente es de -40°C. A esta temperatura la mayor parte del agua ha sido congelada extracelularmente para luego continuar con la inmersión en nitrógeno líquido. El material vegetal puede permanecer durante cierto período de tiempo a esa temperatura antes de su transferencia al nitrógeno líquido.

Una tasa de congelamiento lento de 0.5 °C/min. fue utilizada con éxito por Dussert *et al.* (1991) para conservar uva (*Vitis* spp.), en cítricos (*Citrus deliciosa* Tan) por Aguilar, *et al.* (1993) y Rajasekaran, (1996), en algodón (*Gossypium hirsutum* L.). Panis *et al.* (1990), utilizaron tasas de 1°C/min. para suspensiones celulares de *Musa*.

En la naturaleza y en los sistemas de crioconservación, donde se realiza una lenta disminución de la temperatura, se cree que la cristalización de tejidos vegetales se inicia en los espacios extracelulares, debido a que poco raro células contienen partículas de polvo, o macromoléculas. El descenso gradual de la temperatura provoca que los cristales crezcan. Debido a que sólo una proporción de agua contribuye a que la solución extracelular se congele, esta se vuelve más concentrada, es decir, hipertónico con respecto al agua. Para restaurar el equilibrio osmótico, el agua celular saldrá del protoplasto. Este proceso causa dos efectos: una reducción del volumen celular y un aumento en la concentración de solutos intracelular. Este último efecto disminuirá la temperatura de cristalización de la solución

intracelular residual provocando su nucleación o bien su vitrificación cuando la solución sea suficientemente concentrada (Merymany Williams 1985).

La cristalización de los medios crioprotectoras puede ser inducida manualmente al sumergir por corto tiempo los criotubos en nitrógeno líquido una vez que esta solución se encuentre entre la cristalización y la temperatura de nucleación del medio (Dussert *et al.* 1991; Aguilar *et al.* 1993). Panis *et al.* (1990), realizaron la inducción de la cristalización a -10°C colocando los criotubos en nitrógeno líquido por aproximadamente 0.5 segundos y seguido del congelamiento lento, esto permite evitar el daño causado por el super enfriamiento.

2.3.4.3. Congelamiento escalonado

Este procedimiento consiste en someter el material vegetal a varias temperaturas por debajo de 0°C , en forma sucesiva, y permanecer en cada una de ellas durante cierto tiempo, antes de su inmersión en nitrógeno líquido.

Sugawara y Sakai (1974) utilizaron este procedimiento para crioconservar suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus*.

2.3.5. Almacenamiento

La duración máxima de almacenamiento es teóricamente ilimitada, ya que las muestras son permanentemente guardadas a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C) (Engelmann, 1991).

2.3.6. Descongelamiento

En la mayoría de los casos, el descongelamiento se realiza rápidamente sumergiendo los criotubos conteniendo las muestras en un baño de agua termoestable de aproximadamente 40°C . (Mroginski *et al.* 1991)

Aguilar *et al.* (1993), encontraron que las suspensiones celulares de cítricos (*Citrus deliciosa* Tan.), no son sensibles al recalentamiento, ya que se demostró la recuperación de los cultivos después de utilizar temperaturas de descongelamiento de 40°C y 80°C. Por el contrario, en el caso de suspensiones celulares embriogénicas de uva (Dussert *et al.* 1991), y *Musa* (Panis *et al.* 1990), la sobrevivencia se logro al realizar un descongelamiento rápido.

El descongelamiento tiene por objetivo impedir la fusión de los microcristales de hielo que se forman durante la congelación. Este fenómeno puede provocar la formación de cristales más grandes los cuales pueden dañar la integridad celular. Sin embargo, el descongelamiento lento es a veces necesario (Withers, 1979; Marín y Durán 1988).

2.3.7. Post tratamiento

La última etapa del proceso de crioconservación es la recuperación del material. El post tratamiento consiste en cultivar el material vegetal bajo condiciones que aseguren la recuperación óptima. Las sustancias crioprotectoras son progresivamente eliminadas, ya que éstas resultan tóxicas si se mantienen por mucho tiempo en contacto con el material. En algunos casos, la naturaleza del medio debe ser cambiada (sólido o líquido), para así mejorar el recultivo. Con suspensiones celulares, una fase transitoria a un medio sólido es comúnmente utilizada antes de que se retorne a las condiciones de cultivo líquido (Panis *et al.* 1990). La recuperación del material debe realizarse a cabo en un lugar oscuro, para evitar la foto-oxidación, un fenómeno que es dañino para el material (Benson *et al.* 1989).

Aguilar *et al.* (1993), evaluaron el efecto de la duración del cultivo de las suspensiones celulares crioconservadas en medio sólido antes de retornar al medio líquido. Se determinó que la multiplicación celular en medio líquido fue óptima después de permanecer cinco días en cultivo en medio sólido. Las células de uva necesitaron de una recuperación de 18 días en medio sólido antes de ser retornados al medio líquido (Dussert *et al.* 1991). Contrariamente, Panis *et al.* (1990), recuperaron las células de *Musa* en un medio semi sólido.

2.4. Evaluación de los resultados

La estimación más recomendable para medir la viabilidad es el reecrecimiento después del descongelamiento, pero esto es a veces lento. Sin embargo, es muy importante saber lo más pronto posible si el material sobrevivió después del descongelamiento. Existen dos pruebas para medir la viabilidad del material, que puede ser aplicado inmediatamente después de la descongelación. Las pruebas son :

FDA (diacetato de fluoresceína) : la FDA es absorbido por las células vivas y estas se vuelven fluorescentes, esta fluorescencia es inducida por radiación ultra violeta. Esta prueba es cuantitativa ya que el porcentaje de células florecientes pueden ser contabilizada (Widholm, 1977).

TTC (2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride): el TTC, es reducido en formazón, de color rojo, es el producto de la respiración que ocurre en la mitocondria de las células vivas. Esta prueba es cuantitativa para suspensiones celulares pero es cualitativa para tejidos y órganos grandes (Engelmann, 1991).

Panis *et al.* (1990), observó que la prueba con FDA, es muy precisa para estimar la viabilidad pero no da información de la capacidad de las células para multiplicar. La desventaja de estas dos pruebas es que son destructivas. Los métodos no destructivos para estimar la viabilidad de material han sido encontrados, tales como el análisis cromatográfico de la producción de hidrocarburos volátiles (etileno y etano) por tejidos crioconservados (Benson y Withers 1987).

En suspensiones celulares embriogénicas, la verificación de la conservación de la capacidad de regeneración es un punto clave para evaluar la eficiencia del protocolo establecido. Panis *et al.* 1990 y Aguilar *et al.* 1993), evaluaron el éxito de la crioconservación al someter a regeneración las suspensiones celulares después de la crioconservación para verificar el mantenimiento de la capacidad regenerativa de la suspensión.

2.5. Crioconservación del germoplasma de *Musa*

Las investigaciones en crioconservación de *Musa* son muy limitadas. Sin embargo, se han realizado estudios con embriones cigóticos (Abdelnour *et al.* 1992 a; Villalobos *et al.* 1992; Mora *et al.* 1991), embriones somáticos (Abdelnour y Esalant 1994), callos (Prado, 1991), cultivo *in vitro* de meristemas (Panis, 1986; Panis *et al.* 1994b 1996) y suspensiones celulares embriogénicas (Panis *et al.* 1990, 1992b, 1994d).

2.5.1. Crioconservación de embriones cigóticos

Abdelnour *et al.* (1992), realizaron un protocolo utilizado para crioconservar embriones cigóticos maduros de *M. acuminata* spp. *burmannicoides* tipo Calcutta 4 (AA) y *M. balbisiana* tipo Honduras (BB). Este método consistió en cultivar los embriones por 3 a 5 horas en un medio semi sólido de minerales MS. Subsecuentemente, los embriones fueron desecados bajo el flujo laminar estéril por 0-3 horas y luego transferidos a los criotubos para luego ser inmersos en nitrógeno líquido. El descongelamiento se realizó rápidamente en un baño de agua a 40°C y los embriones se cultivaron en el mismo medio suplementado con 0.5 mg/l de benziladenina (BA). Al final de cada periodo de desecación, se determinó el contenido de humedad de los embriones en un horno a 101 °C. La recuperación de los embriones se realizó en la obscuridad.

Los resultados indican que los embriones de *M. acuminata* y *M. balbisiana* sobrevivieron el congelamiento en nitrógeno líquido utilizando la deshidratación y la técnica de congelamiento rápida. Se determinó que estos genotipos tenían contenidos de humedad similares, por lo tanto su reacción a la deshidratación y al congelamiento fue similar. La mayor sobrevivencia de los embriones crioconservados se logró con la presencia de contenidos de humedad de 11-15 %, después de la deshidratación la sobrevivencia fue de 92 y 83% en *M. balbisiana* y *M. Acuminata*, respectivamente.

2.5.2. Crioconservación de embriones somáticos

Embriones somáticos del cultivar triploide 'Gran Enano' (AAA) se precultivaron en 0.75 M de sacarosa por un día y se pretrataron con 5% de DMSO durante una hora antes del congelamiento lento hasta -40 °C seguidamente las muestras se colocaron en nitrógeno líquido. El descongelamiento se realizó rápidamente en baño maría. La sobrevivencia fue de un 75%, solo el 50% de los embriones germinaron (Abdelnour y Escalant, 1994).

2.5.3. Crioconservación de callos

Prado (1991), evaluó la capacidad de sobrevivencia al congelamiento en NL, de callos de tejidos sub apicales de *Musa* Gran Enano y callos embriogénicos de *Musa acuminata* spp. Malaccensis. Los callos fueron pretratados con concentraciones crecientes de sacarosa y de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y congelados en forma rápida y lenta en NL. Los resultados muestran que los callos que fueron pretratados por 24 y 48 horas en 0.5 M de sacarosa y congelados rápidamente en NL sobrevivieron en un 80 y 75 % después del congelamiento. Mientras que aquellos que se congelaron lentamente sobreviven en un 65% de los casos cuando son pretratados con 0.5 M de sacarosa por 24 horas y en ausencia de DMSO. Los callos que fueron congelados rápidamente, y pretratados con 0.5 M de sacarosa por 72 horas sobreviven un 75%, cuando el congelamiento de los mismos se realizaron en forma lenta los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó sacarosa 0.5M por 24 y 48 horas y 5% de DMSO con un 80 y 75 % de sobrevivencia respectivamente.

2.5.4. Crioconservación de meristemas In Vitro

La dificultad principal de la crioconservación de tejidos organizados como lo son los meristemas, se basa en la complejidad de su estructura. Sin embargo, se han probado dos métodos de crioconservación de meristemas de *Musa*: encapsulación-deshidratación y un método simplificado de congelamiento. Esta técnica se ha optimizado debido a que la tasa de recuperación de los meristemas de banano es muy baja. Se desarrolló como alternativa el precultivo por 2 semanas en un medio que contiene alta concentración de sacarosa (0.4-

0.5 M). Los meristemas fueron inmersos inmediatamente en NL para el almacenamiento. Después del descongelamiento 50% de las yemas meristemáticas se recuperaron (Panis y Swennen, 1994).

3.5 5. Crioconservación de suspensiones celulares

El protocolo de crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas derivado de meristemas del cultivar Bluggoe (*Musa* spp. (ABB) utilizado por Panis *et al.* (1990, 1992b) consistió en una fase de precultivo, la cual se expuso el material en estrés osmótico cultivándolo en 6% de manitol por 2 o 7 días. Los crioprotectantes utilizados fueron 5, 7.5, 10 o 15 % (v/v) DMSO (dimetilsulfoxido), 0.5M de glicerol y 1M de sacarosa. La cristalización extracelular del hielo en el criotubo, fue promovida poniendo los criotubos en NL por 1,3 o 10 segundos hasta alcanzar -5 , -7.5 o -10°C durante el congelamiento lento. El descongelamiento fue llevado a cabo rápidamente a baño maría por 1 minuto hasta que se derritió completamente el hielo. La recuperación de las células fue obtenida en un medio semi sólido conteniendo la mitad de sales MS suplementado con MS vitaminas, 10 g/l de ácido ascorbico, 30 g/l de sacarosa, 100 mg de mioinositol y 10 μm BA.

Los resultados mostraron que 5% de DMSO fue el crioprotectante más efectivo, resultando en 64% de recrecimiento de las células. Se determinó que la inducción de la iniciación a la cristalización del hielo aumentó la tasa de recrecimiento a 92%.

Se ha aplicado el método de congelamiento de suspensiones celulares optimizado a otros cultivares de *Musa* (Bluggoe (ABB), Monthan (AAB), Cardaba (ABB), 'Three hand Planty' (AAB). Los resultados fueron exitosos, lo cual indicó que la capacidad de las suspensiones celulares para la preservación en NL, no depende del genotipo sino de la calidad de la suspensión (Panis *et al.* 1994).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del ensayo

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica; entre enero y noviembre de 1998.

3.2. Material

3.2.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado en la presente investigación consistió de suspensiones celulares de Gros Michel '3' (AAA), Dominico'1' (AAB), Curraré '3' (AAB), SF '265' (AA), Col '49 2.8' (AA) las cuales se iniciaron a partir de callos derivados de flores masculinas inmaduras. Solo el cultivar Curraré '3' (AAB) la cual se inició a partir de callos derivados de flores femeninas. Este material se estableció en el laboratorio de Biotecnología del CATIE, con excepción al SF '265' y Col '49 2.8' que se sembraron en la isla de Guadalupe. Cabe mencionar que este material tiene varios meses de subcultivo.

3.3. Metodología

3.3.1. Cultivo *in vitro*

Las suspensiones celulares de tejidos embriogénicos friables fueron iniciados a partir de flores inmaduras de acuerdo a Escalant *et al.* (1994) y Grapin *et al.* (1998) en un medio designado como Ma2. Este corresponde del medio básico de Murashige y Skoog (1962), los que fueron suplementado con $4.1\mu\text{M}$ biotina, $4.5\mu\text{M}$ 2,4 ácido diclorophenoxy acético, $680\mu\text{M}$ glutamina, 100mg l^{-1} de extracto de malta (Sigma) y 130 mM de sacarosa. Las suspensiones fueron cultivadas en erlenmeyers de 250ml sobre un agitador de rotación a 100 r.p.m. En cada subcultivo de la suspensión, la densidad inicial fue ajustada al 3% del volumen celular (PCV) en 50 ml de medio. El medio fue cambiado cada 15 días. Para

todos los experimentos de crioconservación, las células utilizadas se encontraban en la fase de crecimiento exponencial (8-10 días después de la última transferencia).

El desarrollo de los embriones fue obtenido plateando las células en un medio designado como Ma3, que corresponde al medio básico de Schenk y Hilderbrandt (1972), vitaminas MS, 4.1 μM biotina, 680 μM glutamina, 2 mM prolina, 100mg l⁻¹ extracto de malta, 1,1 μM ácido naftacético, 0.2 μM zeatina, 0.5 μM kinetina, 0.7 μM N6-(2 isopentil) adenina, 130 mM sacarosa, 29 mM lactosa y solidificado con 7g l⁻¹ de agarosa.

La regeneración de los embriones fue realizada en un medio designado como Ma4, el cual consiste en un medio MS suplementado con 0.2 μM 6-benzilaminopurina, 1.1 μM ácido indolacético, 87 mM sucrosa y 4g l⁻¹ de gelrite. Los embriones fueron germinados en cajas petri (9.5 cm de diámetro). Veinte y cinco embriones se seleccionaron al azar y se colocaron por caja, donde permanecieron por 1-2 meses.

3.3.2. Crioconservación

En esta investigación se tomó como referencia el protocolo de crioconservación de *Musa* realizado por Panis *et al.* (1990). En cada experimento se modificó una de las variables para determinar su influencia en la calidad de la suspensión celular después de la crioconservación.

3.3.2.1. Efecto del precultivo

Se realizaron ensayos preliminares para el precultivo de las suspensiones celulares en el medio básico modificado con diferentes concentraciones de sacarosa (90 135, 180 g/l (y lactosa (10 g/l) por uno o siete días antes de la crioconservación. Los tratamientos seleccionados fueron 135 g de sacarosa y lactosa (10 g/l) por 7 días. Se conservó la concentración de sacarosa definida durante el pretratamiento.

3.3.2.2. Crioprotección o pretratamiento

Como sustancias crioprotectores se utilizó DMSO al 7.5 % y diferentes concentraciones de sacarosa (0.13 M, 0.26 M, 0.39 M y 0.53 M). Las células se pretrataron con el medio crioprotector por una hora en un baño de hielo. Inicialmente, la concentración de este medio crioprotectante estaba dos veces más concentrada que el volumen final. El DMSO fue añadido gradualmente en 5 alícuotas hasta completar el volumen durante la hora. Cada criotubo portaba 1 ml que contenían 30% de SCV de células. En experimentos para probar otras variables, las células se pretrataron con 0.13 M y 7.5 % de DMSO.

3.3.2.3. Congelamiento

Las suspensión pretratadas se dividió en muestras de 1 ml y se transfirió en criotubos de 1.5 ml. Estas muestras fueron congeladas a una tasa de 1 °C/min hasta -40°C y luego inmersas en NL para el almacenamiento por 24 horas. Dependiendo del experimento, la cristalización del medio crioprotector durante el congelamiento lento fue inducida automáticamente en el congelador programable (CRYOMED). La inducción de la cristalización se inició a una temperatura de -10° C.

3.2.2.4. Descongelamiento

El descongelamiento fue llevado acabo rápidamente en un baño maría a 40°C por aproximadamente 2 minutos hasta la fusión completa de los criotubos.

3.2.2.5. Recuperación de las células crioconservadas

La recuperación de la suspensión celular después de la descongelación se realizó colocando el volumen celular del criotubo sobre papel filtro de la caja petri que contenían 20 ml de medio sólido Ma2. Después de 1, 24 y 48 horas, el papel filtro con las células fue transferido a medio fresco. Cuando se utilizó altas concentraciones de sacarosa durante el pretratamiento, ésta se disminuyó progresivamente con varios subcultivos que contenían un

bajo nivel hasta llegar a la concentración estándar. Este ensayo consistió de 3 repeticiones. Después de 2 semanas, estas células se transfirieron a medio líquido para reiniciar las suspensiones. En este momento, se inició la medición de la tasa de multiplicación por 15 días. Otras 3 repeticiones se colocaron en el medio MA3 para evaluar la capacidad de regeneración durante 11 semanas.

Para optimizar la técnica de recuperación celular se procedió a evaluar la recuperación celular en medio sólido bajo el sistema de plaqueo a alta densidades (agrupamiento celular) y baja densidad (todo en medio). También se evaluó el efecto de la recuperación en medio líquido, sin el pasaje de las células por una fase transitoria en medio sólido, esto con el objetivo de simplificar el modo de recuperación. El primer tratamiento consistió en eliminar el medio crioprotector y realizar un lavado (enjuague) con el medio MA2 líquido 3% de DMSO. Un segundo tratamiento no contenía DMSO, solamente medio MA2 normal. Luego de realizar el lavado por un hora, se mantuvo las células en un medio líquido Ma2 bajo agitación.

3.3.2.6. Determinación de la viabilidad

La viabilidad de las células fue determinada con la prueba de coloración con diacetato de fluoresceína (FDA) antes y después de la descongelación. Se contó 50 agregados al azar con el uso de un microscopio y se determinó el número de fluorescencia visible en cada porcentaje de clasificación utilizado. Se siguió la metodología de Engelmann, (1998) (comunicación personal) Anexo 1.

3.3.2.7. Crioconservación de varios cultivares de *Musa*

En este experimento se probó la capacidad de la recuperación de las células después de la descongelación con varios genotipos de *Musa* (triploides y diploides). Se utilizó el protocolo optimizado de los ensayos realizados anteriormente. Se utilizó el mismo programa para la inducción de la cristalización y el pretratamiento con 45 g/l de sacarosa,

7.5 % DMSO. Los cultivares crioconservados son: Gros Michel '3' (AAA), Dominico '1' (AAB), Curraré '3' (AAB), SF '265' (AA) y Col '49 2.8' (AA).

3.3.2.8. Expresión de los resultados

En todos los experimentos se realizó la prueba de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA) 48 horas antes y después de la descongelación. La viabilidad celular fue determinada con base al porcentaje promedio de células vivas de 50 agregados celulares seleccionadas al azar y observado con el uso de un microscopio (Microphot-FX Nikon).

En lo que respecta la medición del incremento del volumen celular (crecimiento celular), ésta fue medida por 15 días después de la etapa de recuperación en medio sólido (15 días).

El número de embriones fue cuantificado 11 semanas después de la descongelación. La cuantificación se realizó tomando muestras de 0.01g.

Después de dos meses de cultivo de los embriones en Ma4, se determinó el porcentaje de germinación de 100 embriones para cada ensayo. Se realizó varios testigos. Estos consistieron en (1) células no crioconservadas que fueron puestos en Ma2 líquido para medir el crecimiento celular por 15 días, (2) células que fueron transferidas en un medio para la formación de embriones (Ma3), (3) y la evaluación de la viabilidad celular antes de la congelación con FDA. Cabe mencionar que también, hubo un testigo crioconservado el cual consistió en mantener constante el pretratamiento (45 g/l de sacarosa y 7.5 % de DMSO), en todos los ensayos realizados.

3.3.4. Estudios histológicos

Estudios histológicos fueron realizados para todos los ensayos antes de la crioconservación y 48 horas después de la descongelación.

Las muestras fueron fijadas por 48 horas en un buffer fosfato que contenía 2% de paraformaldehído, 1% de acroleína, 2% de glutaraldehído y 1% de cafeína. Después las muestras fueron deshidratadas con transferencias sucesivas de baños de alcohol con un aumento progresivo de concentración. La inclusión fue realizada en resina (Kulser 7100). Los cortes fueron realizados con un microtomo automático (Historange 2218, LKB) en secciones de 3 μ m de grosor. La tinción se realizó con el reactivo de Schiff y Naphtanol blue black. Esta doble tinción permitió la determinación de polisacáridos, los cuales se tiñen de rojo y las proteínas solubles y no solubles que se tiñen de azul (Manual de pratique D'Histologie vegetale, 1989).

3.3.5. Análisis Estadístico

El análisis de los datos se realizó con el apoyo del programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 1988), mediante el procedimiento GLM, dentro del cual se estimó las diferencias de medias de los tratamientos por medio de análisis de varianza y con la comparación de medias por el criterio de Duncan. En casos necesario, se utilizó la prueba de 't' de student para hacer comparaciones de dos medias.

Las variables de respuesta utilizadas en los ensayos son: incremento del volumen celular (mi SCV)), número de embriones y porcentaje de germinación. También se cuantificó el porcentaje promedio de fluorescencia celular antes y después de la crioconservación.

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de varios protocolos de criopreservación sobre la regeneración de suspensiones celulares de *Musa* spp.

4.1.1. Crecimiento de las suspensiones celulares después de la criopreservación.

La medición del crecimiento o la multiplicación de las suspensiones celulares después de la criopreservación juega un papel muy importante para determinar la sobrevivencia de la capacidad embriogénica. Por este motivo, se realizó cinco ensayos modificando en cada uno de ellos una de las etapas del protocolo de criopreservación para analizar el crecimiento en las suspensiones celulares. Los primeros cuatro ensayos fueron realizados con el cultivar Dominico '1' y el último con otros cultivares Gros Michel '3', SF '265', Curaré '3' y Col '49 2.8'.

El análisis de varianza realizado en forma independiente para cada uno de los ensayos muestra que en general existen diferencias significativas del crecimiento celular entre los tratamientos de un mismo ensayo (Fig. 1).

En el ensayo uno, se determinó que no existen diferencias significativas entre las medias de del testigo y el tratamiento que llevó a cabo el proceso de la inducción de la cristalización. En contraste, en el tratamiento sin la inducción a la cristalización, no hubo crecimiento celular.

En el segundo ensayo se comparó diferentes concentraciones de sacarosa durante la fase del pretratamiento. Los resultados estadísticos identificaron la existencia de dos grupos: en el grupo (A) se obtuvo el mayor crecimiento celular fue con los tratamientos de 90 y 135 g/l de sacarosa, mientras que se observó el menor crecimiento celular en el grupo (B) con 45 y 180 g/ de sacarosa.

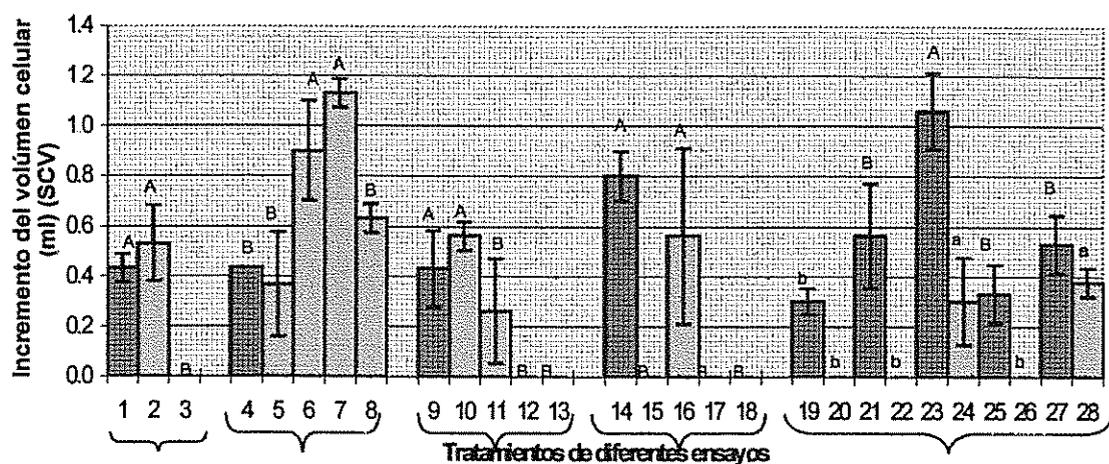


Fig. 1. Incremento del volúmen celular de suspensiones celulares crioconservadas 30 días después de la descongelación en los cinco ensayos realizados. (La significancia estadística representada por letras se evaluó al 0.01. Para cada tratamiento, se utilizó tres repeticiones).

Ensayo 1:

- (1) Testigo Dominico
- (2) Con inducción a la cristalización
- (3) Sin inducción a la cristalización

Ensayo 2:

- (4) Testigo Dominico
- (5) 45 g/l sacarosa
- (6) 90 g/l sacarosa
- (7) 135 g/l sacarosa
- (8) 180g/l sacarosa

Ensayo 3:

- (9) Testigo Dominico
- (10) Agrupamiento celular en el centro de la caja petri (Alta densidad)
- (11) Distribución celular en forma dispersa de la caja petri (baja densidad)
- (12) Medio líquido
- (13) Medio líquido+3% de DMSO

Ensayo 4:

- (14) Testigo Dominico
- (15) 45 g/l de sacarosa
- (16) 135 g/l sacarosa
- (17) 10 g/l de lactosa (1 día)
- (18) 10 g/l de lactosa (7 días)

Ensayo 5:

- (19) Dominico '1' Testigo
- (20) Dominico '1' crioconservado
- (21) Gros Michel '3' Testigo
- (22) GM crioconservado
- (23) SF '265' Testigo
- (24) SF '265' crioconservado
- (25) Curaré '3' Testigo
- (26) Curaré '3' crioconservado
- (27) Col '49 2.8' Testigo
- (28) Col '49 2.8' crioconservado

El tercer ensayo consistió en el modo de recuperar e reiniciar la suspensión celular después de ser criopreservada. En este ensayo se identificó dos grupos, uno, que obtuvo el máximo crecimiento celular en el tratamiento de agrupación de las células en la parte central de la caja petri en medio sólido (0.5 ml), incluyendo también al testigo y el segundo grupo en donde hubo menor crecimiento (0.3ml). Sin embargo, en este segundo grupo se muestra también los tratamientos en medio líquido, donde no hubo multiplicación celular.

Los resultados obtenidos en el cuarto ensayo el cual estuvo compuesto por una etapa de precultivo de 1 o 7 días (sacarosa y lactosa) indican la presencia de dos grupos: cuando se utilizó un precultivo de 7 días con 135 g/l de sacarosa, al igual que en el testigo hubo multiplicación celular, mientras que en el segundo grupo que incluye los tratamientos con lactosa no hubo multiplicación celular.

En el quinto ensayo, a diferencia de los anteriores, el cual se realizó con diferentes genotipos (Dominico, Gros Michel '3', SF '265', Curaré '3', y Col '49 2.8'). Los resultados mostraron que solamente se logró multiplicación en las suspensiones criopreservadas en los genotipos SF'265' (trat.24) y Col '49 2.8' (trat.28) con 0.3 ml en ambos casos. En lo que respecta a los testigos, en todos hubo crecimiento celular, pero solamente el genotipo SF '265' (trat.23) tuvo una diferencia significativa con los restantes con una multiplicación de 1.0 ml (SCV).

En la figura 2, se puede observar una suspensión celular que se reinició a partir de células criopreservadas de Dominico '1' (6 meses después de la criopreservación). La modificación del protocolo base fue con el pretratamiento de 45 g de sacarosa y 7.5% de DMSO, y con inducción de la cristalización automática en el congelador programable (CRYOMED).

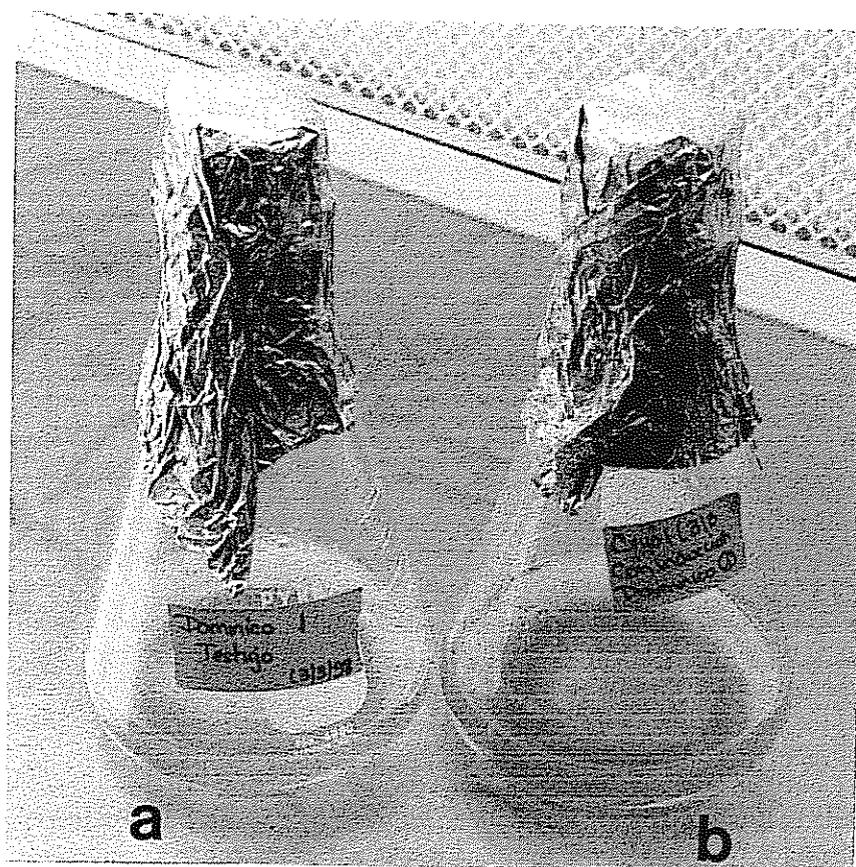


Fig. 2. Suspensión celular de Dominico '1' reiniciada a partir de células crioconservadas a) no crioconservada, b)crioconservada.

4.1.2. Formación de embriones a partir de suspensiones celulares crioconservadas.

La segunda etapa de la investigación consistió en la evaluación de la recuperación de la suspensión celular después de la crioconservación para verificar si el material conservo su capacidad embriogénica. Después de 7 semanas en un medio de formación de embriones (Ma3) se pudo observar la presencia de los mismos.

Se realizó el análisis estadístico en forma independiente para cada uno de cinco ensayos (Fig. 3). Sin embargo, es necesario mencionar que no se pudo hacer comparaciones directamente entre el testigo y los tratamientos ya que la manera de platear las suspensiones después de la descongelación fue diferente a la manera de platear el testigo.

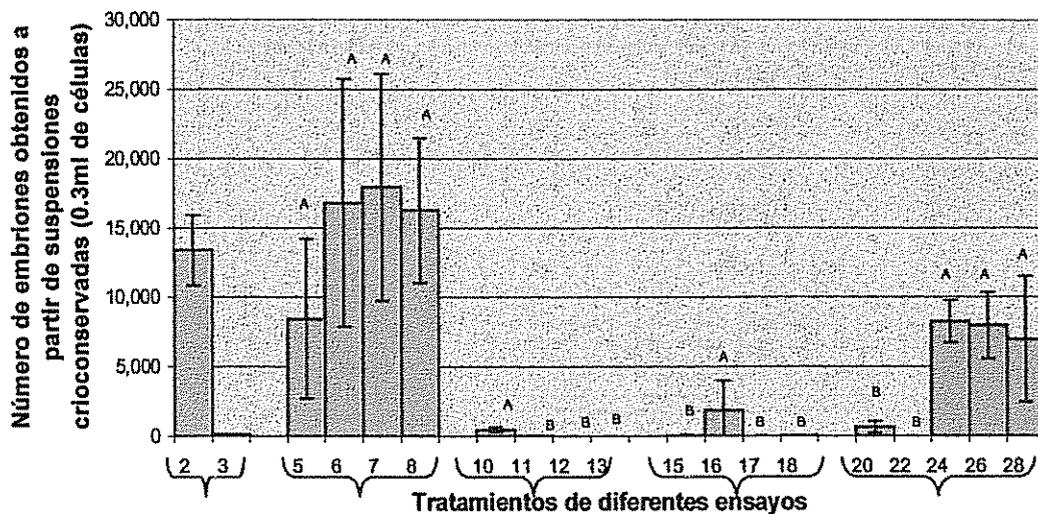


Fig. 3. Número de embriones formados a partir de suspensiones celulares crioconservadas para los cinco ensayos estudiados. (La significancia estadística representada por letras se evaluó al 0.01).

Los resultados de la prueba de 't' de Student para el ensayo 1, determinó que existen diferencias significativas entre las medias de los dos tratamientos. En el tratamiento con inducción de la cristalización durante el congelamiento, hubo formación de aproximadamente 13,300 embriones (0.3 ml de células), mientras que en el tratamiento sin inducción, solamente hubo formación de 50 embriones para el mismo volumen de suspensión.

En la figura 4, se observa la formación de embriones en el tratamiento con inducción de la cristalización, después de estar en medio líquido por un mes.



Fig. 4. Formación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservados de Dominico '1' (a) con inducción de la cristalización, (b) sin inducción de la cristalización.

Para el segundo ensayo en el cual se comparan diferentes niveles de sacarosa (45, 90, 135, y 180 g/l) no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al número de embriones formados, sin embargo, observaciones visuales indican que si hubo diferencias respecto al tamaño de los embriones. En el tratamiento con 45 y 180 g/l sacarosa se observan embriones de mayor tamaño mientras que con 90 y 180 g/l de sacarosa los embriones son más pequeños (Figura 5).

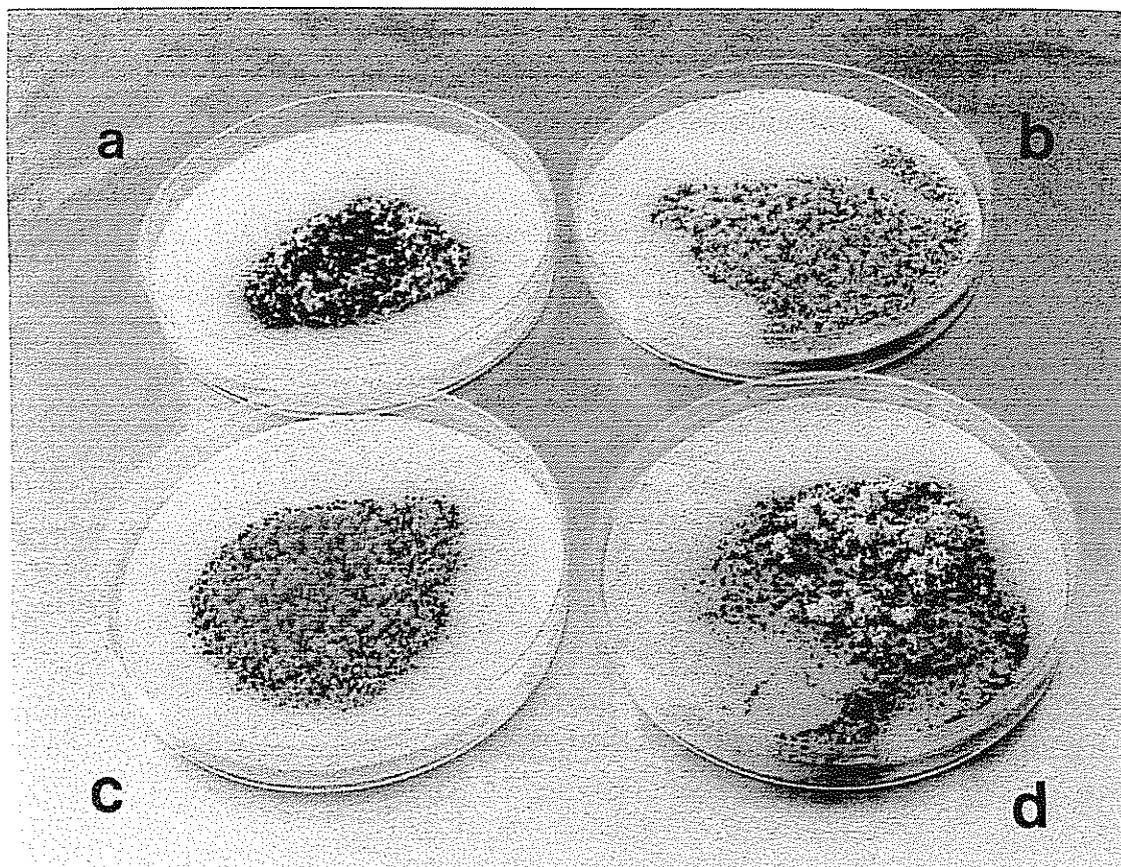


Fig. 5. Formación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas de cv. Dominico (*Musa*) las cuales fueron pretratadas con diferentes concentraciones de sacarosa. (a) 45 g/l, (b) 90 g/l, (c) 135 g/l, (d) 180 g/l de sacarosa.

En el tercer ensayo, que consistió en el modo de recuperación de las células, solamente hubo formación de embriones en el tratamiento que tuvo el agrupamiento celular en el centro de la caja petri (alta densidad). Sin embargo, el testigo (no criopreservado) tuvo muy baja formación de embriones.

Para el cuarto ensayo, en el cual se comparan diferentes tratamientos de precultivo (sacarosa y lactosa), se determinó dos grupos de respuesta: un primer grupo con formación de embriones en presencia de 135 g/l de sacarosa (trat 16), y un segundo grupo con poca (45 g/l de sacarosa) o ninguna (lactosa) formación de embriones.

En lo que respecta el quinto ensayo, en el cual se utilizó varios genotipos de *Musa*, se logró la formación de embriones en todos los tratamientos con excepción de Gros Michel (trat. 22). Las medias del número de embriones formados en las suspensiones celulares de SF 265, Curraré 3 y Col 49 2.8 no fueron significativamente diferentes (trat. 24, 26 y 28).

En las figuras 6,7, 8, 9 y 10, se observa la recuperación y formación de embriones de la aplicación del protocolo optimizado a diferentes cultivares de *Musa* spp.



Fig. 6. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de Dominico '1'. Once semanas después de la descongelación. (a) testigo, (b) crioconservado.



**Fig. 7. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de Col '49 2.8'.
a) testigo, (b) criopreservado.**



**Fig. 8. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de Gros Michel
'3' a) testigo, (b) criopreservado**



Fig. 9. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de Curraré '3'
'3' a) testigo, (b) criopreservado.

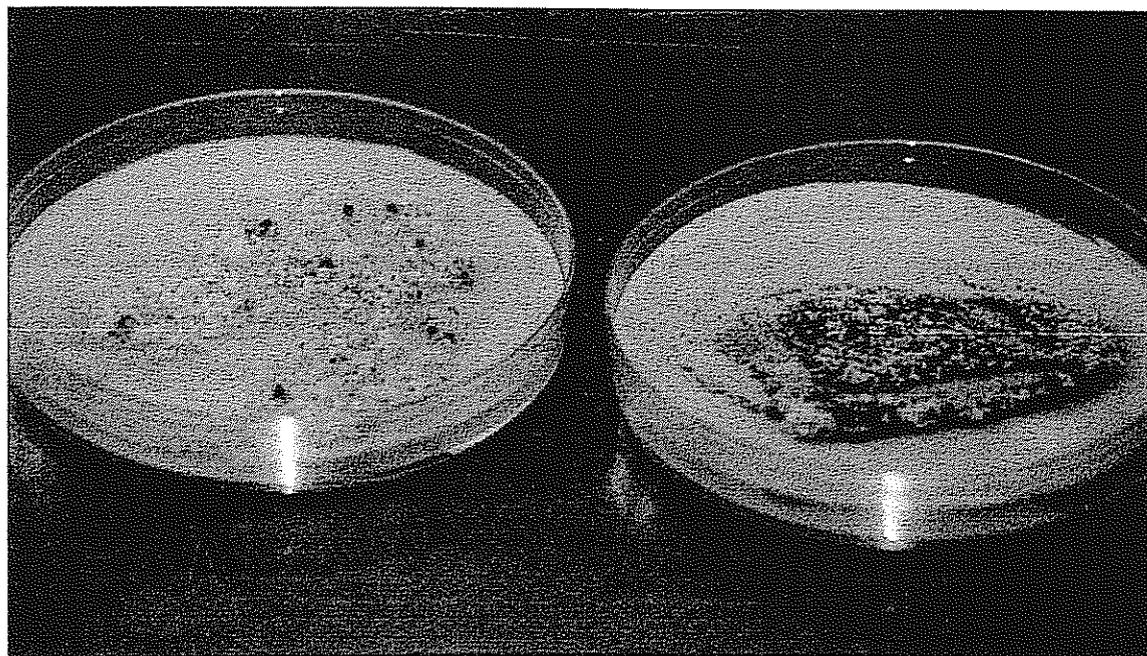


Fig. 10. Formación de embriones derivados de suspensiones celulares de SF '265'
'3' a) testigo, (b) criopreservado.

4.1.3. Germinación de embriones provenientes de suspensiones celulares crioconservadas.

Once semanas después de la descongelación, los embriones fueron transferidos en un medio para su germinación. El análisis estadístico del porcentaje de germinación fue realizado de forma independiente para los tres ensayos que formaron embriones (Fig. 11).

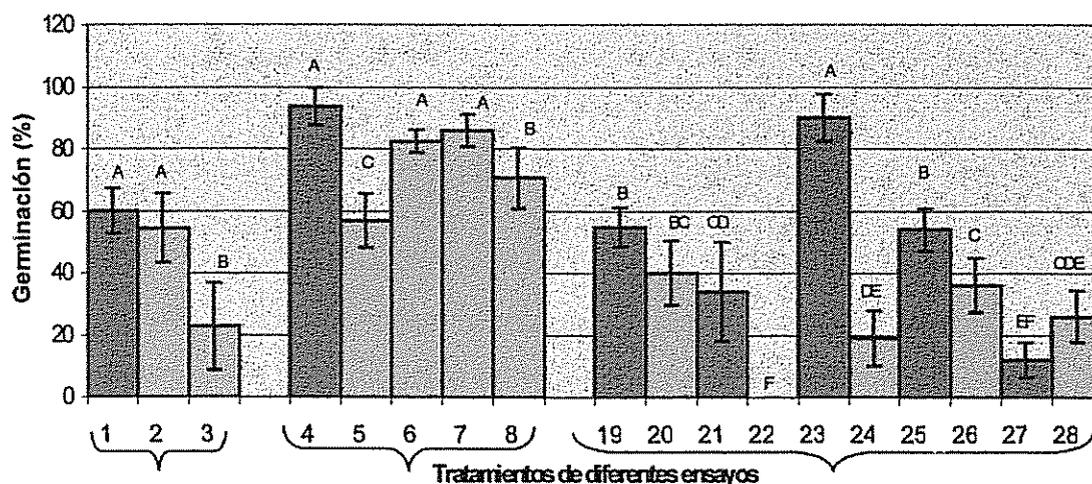


Fig. 11. Porcentaje de germinación del ensayo 1, 2 y 5. (La significancia estadística representada por letras se evaluó al 0.01. Ver descripción de los tratamientos en anexo2.

En el ensayo uno, el porcentaje de germinación para el tratamiento con inducción de la cristalización no fue significativamente diferente al testigo (no crioconservado) ya que hubo un porcentaje de 54 y 59% respectivamente. En cambio para el tratamiento sin dicho proceso tuvo un menor porcentaje de germinación (22%).

En la figura 12, se puede observar la capacidad de germinación de los embriones provenientes de suspensiones celulares crioconservadas.

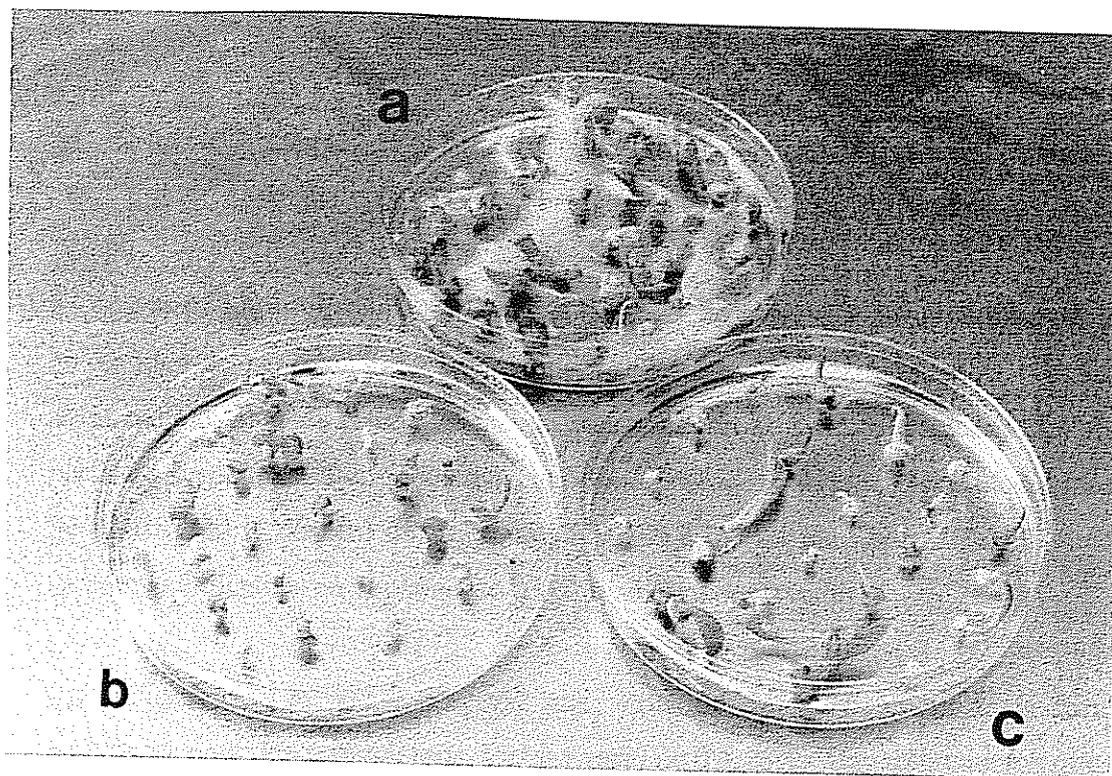


Fig.12. Germinación de embriones provenientes de suspensiones celulares criopreservadas (a) testigo, (b) sin inducción de la cristalización, (c) con inducción de la cristalización.

El análisis estadístico para el ensayo 2, demostró que el promedio del porcentaje de germinación del testigo no tuvo diferencias significativas con respecto a los tratamientos que fueron pretratados con 90 g/l y 135 g/l de sacarosa, pero sí con aquellas pretratadas con 45 y 180 g/l de sacarosa. Sin embargo, la media del porcentaje de germinación del tratamiento pretratado con 45 g/l fue menor que con 180 g/l de sacarosa.

En el quinto ensayo, en el cual se estudio el porcentaje de germinación de varios genotipos, se pudo determinar que las medias del porcentaje de germinación de Dominico '1' y Col '49 2.8' criopreservados no fueron significativamente diferentes con sus respectivos testigos (trat.19, 20, 27 y 28), mientras que el porcentaje de germinación de los demás genotipos criopreservados difieren con sus testigos. Cabe mencionar, que el promedio del porcentaje de germinación de SF '265' y Curraré '3' fueron menores que sus testigos.

4.1.4. Eficiencia de la formación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas en los tratamientos estudiados.

Es de mucha importancia cuantificar la eficiencia de cualquier protocolo para determinar si en realidad vale la pena hacer el tratamiento. En esta investigación, se calculó la eficiencia de la metodología de criopreservación relacionando el número de embriones formados a partir de suspensiones criopreservadas / el número de embriones formados en los testigos. Se transformó el número de embriones testigos a 0.3 ml para normalizar la concentración de células utilizadas en el plating de las células criopreservadas.

En la figura 13, se puede observar una variación de la eficiencia de la formación de embriones entre los tratamientos. La tasa varió de 0 a 26%. Hay tratamientos que no fueron eficientes, como el tratamiento 3, 12, 13, 17, 18, 20 y 22. Sin embargo, la eficiencia se concentró en los tratamientos donde se realizó el proceso de inducción de la cristalización, en los tratamientos con altos niveles de sacarosa, en el tratamiento que tuvo una recuperación celular con alta densidad celular, con el precultivo de 135 g/l de sacarosa y en los genotipos: SF '265', Curraré '3,' y Col '49 2.8'.

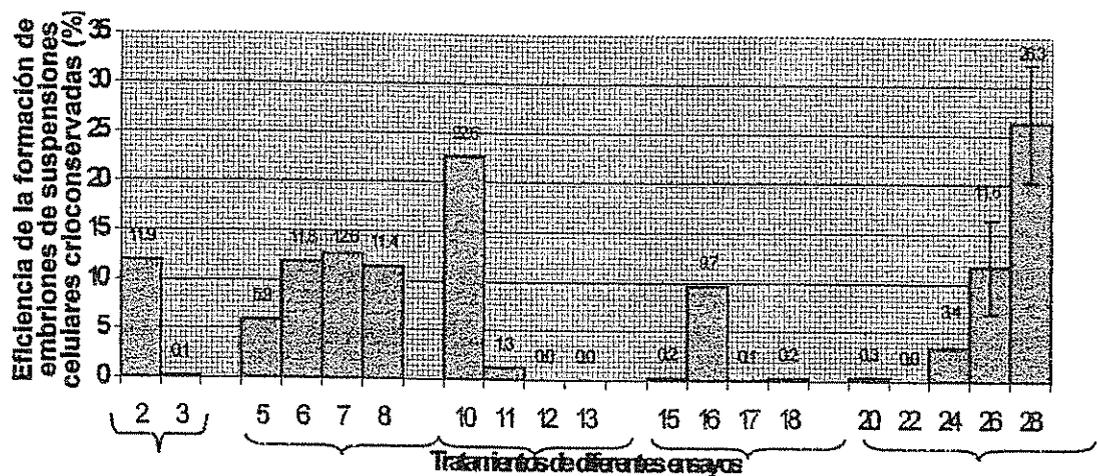


Fig. 13. Eficiencia de la formación de embriones obtenida a partir de suspensiones celulares criopreservadas en los tratamientos estudiados. Ver descripción de los tratamientos en anexo 2.

4.2. Características de la regeneración relacionadas con la eficiencia de la criopreservación.

4.2.1. Eficiencia de la formación de embriones con el incremento relativo del volumen celular y el porcentaje de germinación

La tasa de multiplicación de las células después de la criopreservación es un parámetro para decir si las células mantuvieron la capacidad embriogénica después de la criopreservación. Para poder determinar si existió relación entre la eficiencia de formación de embriones después de la criopreservación y el crecimiento celular, se procedió a calcular el incremento relativo del volumen celular con base al incremento del volumen de células criopreservadas / incremento del volumen celular del testigos (no criopreservada).

En la figura 14, se puede observar que el incremento relativo del volumen celular parece estar relacionado con la eficiencia de la formación de embriones, aunque se ve hay excepciones como Col '49 2.8' (trat. 28) ya que obtuvo 26% de eficiencia pero tuvo un menor crecimiento celular que los demás tratamientos (0.7 ml) y Curraré '3' (trat. 26) en la cual hubo formación de embriones pero no hubo multiplicación celular después de la criopreservación.

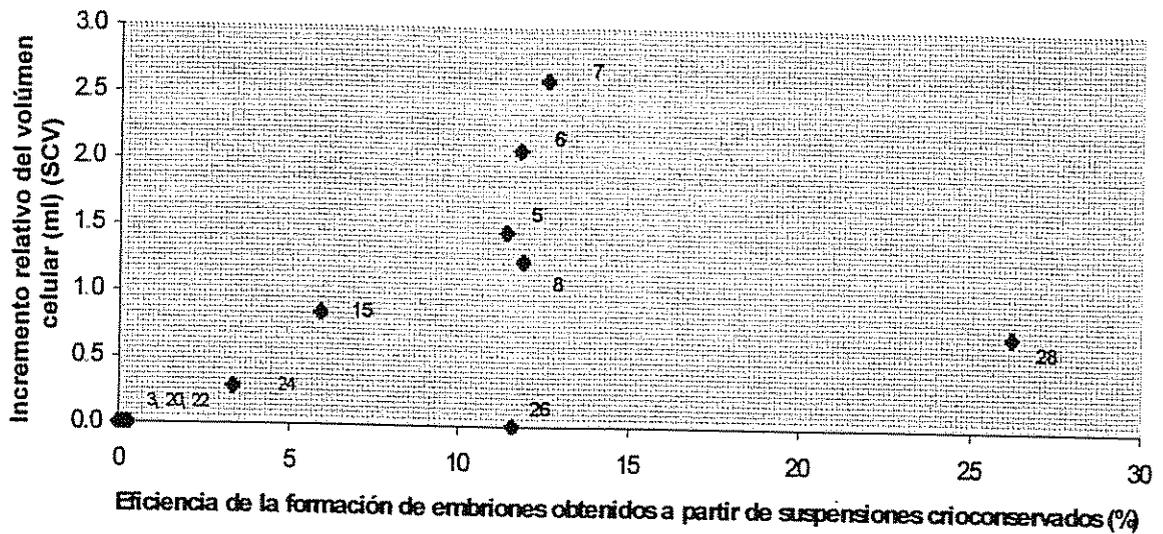


Fig. 14. Relación de la eficiencia de la formación de embriones y el incremento relativo del volúmen celular. Los números corresponden a los tratamientos analizados. Ver descripción de los números (tratamientos) en anexo 2.

Igualmente con lo anterior, se puede ver que la eficiencia de la formación de embriones de las células crioconservadas y el porcentaje de germinación tienen una tendencia casi directa con excepción al genotipo Col '49 2.8' (tratamiento 28) (Fig. 15).

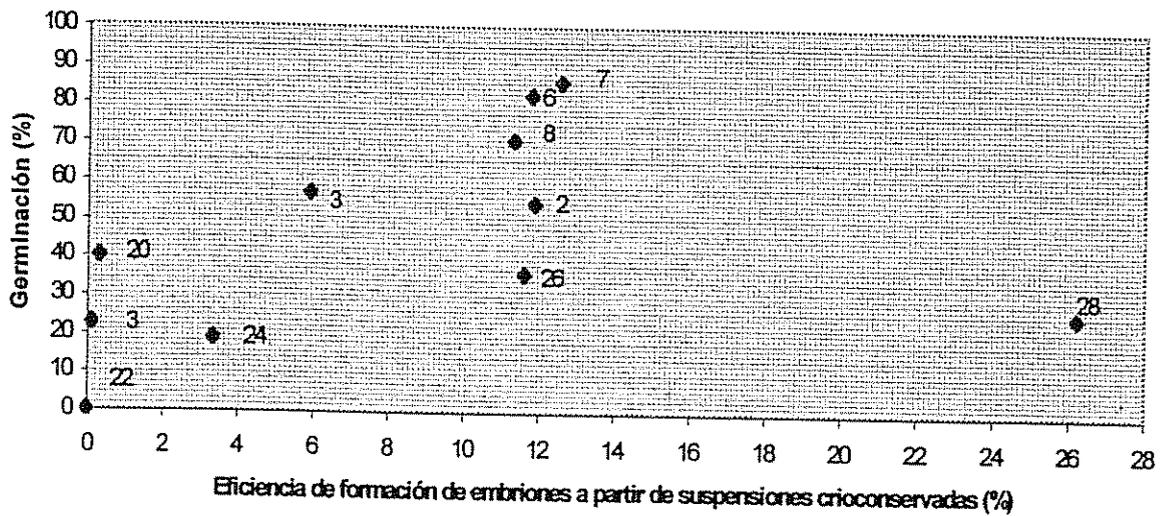


Fig. 15. Relación entre el porcentaje de germinación y la eficiencia de la formación de embriones crioconservadas. Ver descripción de los números (tratamientos) en anexo 2.

La tendencia casi directa entre el número de embriones formados y el porcentaje de germinación no es un resultado particular de la crioconservación, ya que esta característica también se presenta en embriones provenientes de células testigos (no crioconservadas) (Fig. 16).

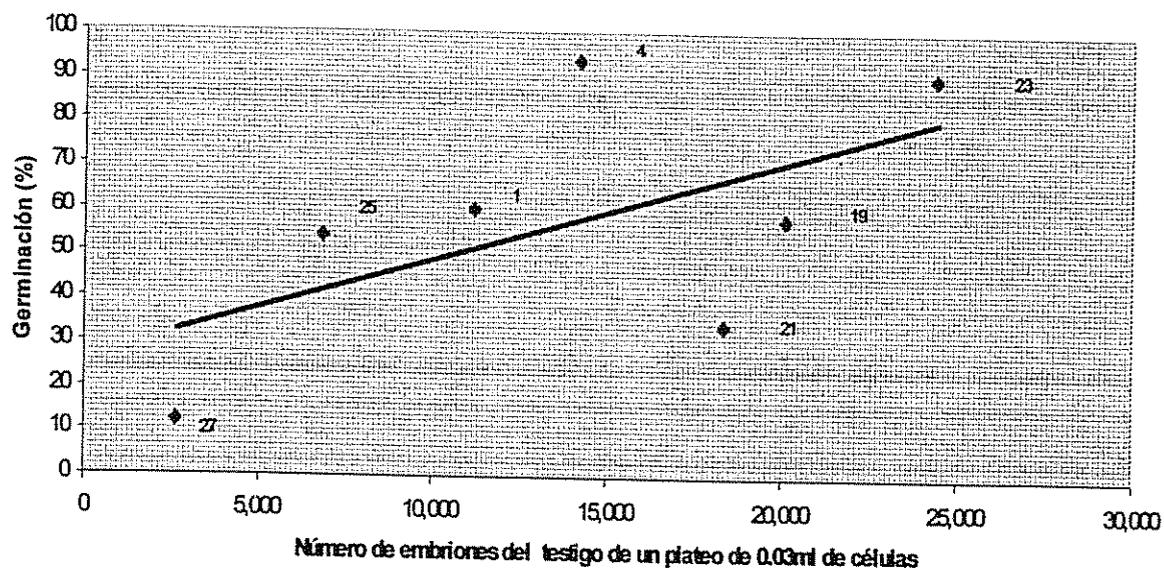


Fig. 16. Relación entre el porcentaje de germinación y el número de embriones del testigo (no crioconservado). Los números corresponden a los tratamientos analizados. Ver descripción de los números (tratamientos) en anexo 2.

4.2.2 Características histológicas de las suspensiones celulares testigos de los cultivares utilizados.

4.2.2.1. Dominico '1': (AAB).

Ensayos 1, 2, 3 y 4

El material utilizado fue muy heterogéneo, ya que consistió de agregados friables, con células embriogénicas (núcleo bien definido, nucléolo prominente, alta relación núcleo citoplasma, poca cantidad de granos de almidón) sin embargo, también se encontró células no embriogénicas con citoplasma vacío y vacuolas grandes. Además, se observó presencia de nódulos con grandes granos de almidón.

Ensayo 5

La suspensión celular utilizada contenía tanto células embriogénicas como meristemáticas. Sin embargo se encontró aproximadamente 5-10% de células viejas. Una de las características principales de esta suspensión fue que había aproximadamente 20% de acumulación de almidón en los agregados (Fig. 17 a).

4.2.2.2. Gros Michel '3' (AAA)

Esta suspensión estuvo constituida por agregados de diferentes tamaños, con poco contenido citoplasmático y con células aisladas. Hubo aproximadamente 90% de células viejas o diferenciadas (Fig. 18 a).

4.2.2.3. Curraré '3' (AAB)

Esta suspensión fue muy heterogénea, contenía aproximadamente 50% de células embriogénicas y 50% de células viejas con grandes vacuolas, citoplasma vacío y granos grandes de almidón (Fig. 19 a).

4.2.2.4. SF '265' (AA)

Esta suspensión estuvo formada por agregados meristemáticas, de menor tamaño que Curraré 3, con núcleos grandes en la posición central, con citoplasma denso y con menor contenido de almidón. Se encontró menor cantidad de células embriogénicas con aproximadamente 30% de células viejas (Fig. 20 a).

4.2.2.5. Col '49 2.8' (AA)

La suspensión celular de este genotipo consistió de aproximadamente 90 % de estructuras proembrionarias. Se observó agregados con células embriogénicas que presentaban citoplasmas densos, con núcleos y nucleólos bien definidos y de gran tamaño. Estas células muestran muy poca acumulación de almidón (Fig. 21 a).

4.2.3. Características histológicas de las suspensiones celulares, 48 horas después de la descongelación.

El estudio histológico de la suspensión celular utilizada en todos los experimentos después de la descongelación, reveló en general la presencia de daño (plasmolisis) a nivel del núcleo y citoplasma, como también células que mantenían las características embriogénicas en muy buen estado (Fig. 17 b, 18 b, 19 b, 20b, 21b).

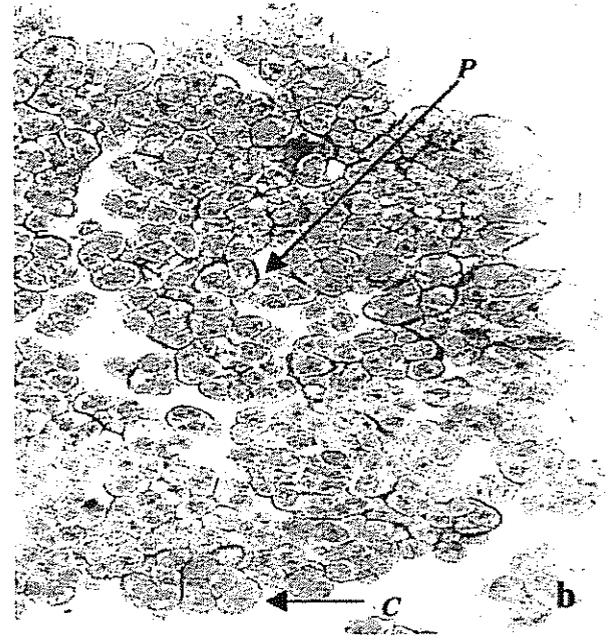
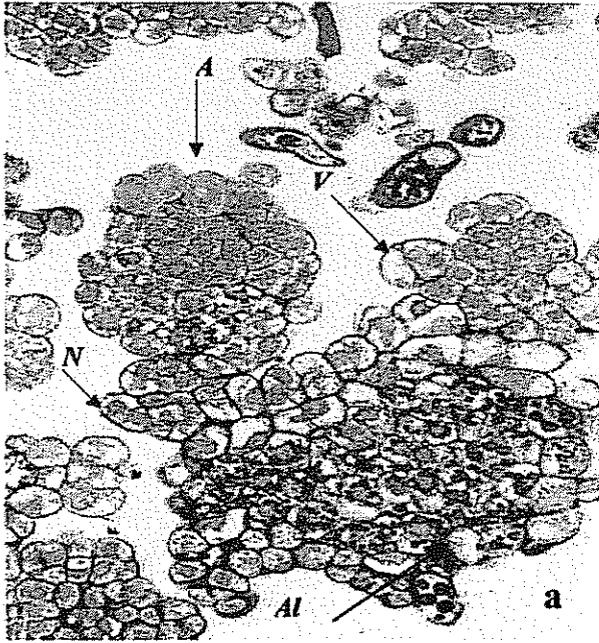


Fig. 17 a). Suspensión celular embriogénica de Dominico '1' Testigo (X 20)

A: agregados *V:* vacuolas, *N:* núcleo, *Al:* almidón, *D:* división celular.

b) Suspensión celular criopreservada de Dominico '1'(x 20), *C:* citoplasma, *P:* plasmolisis.

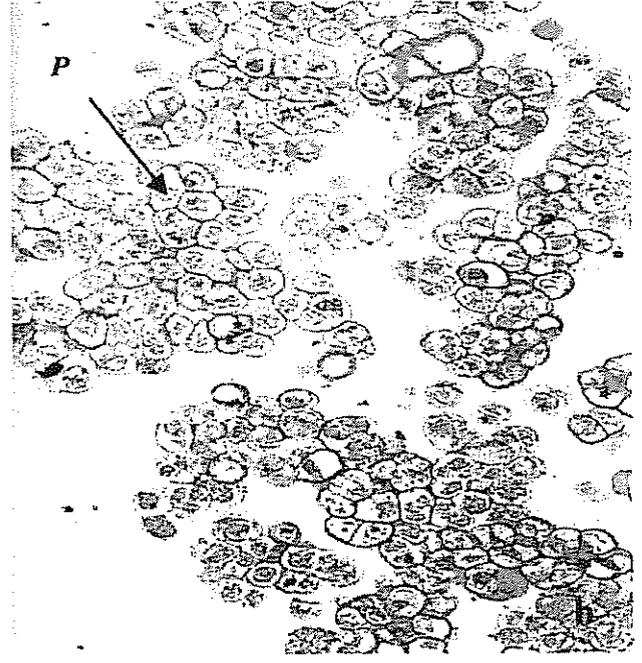
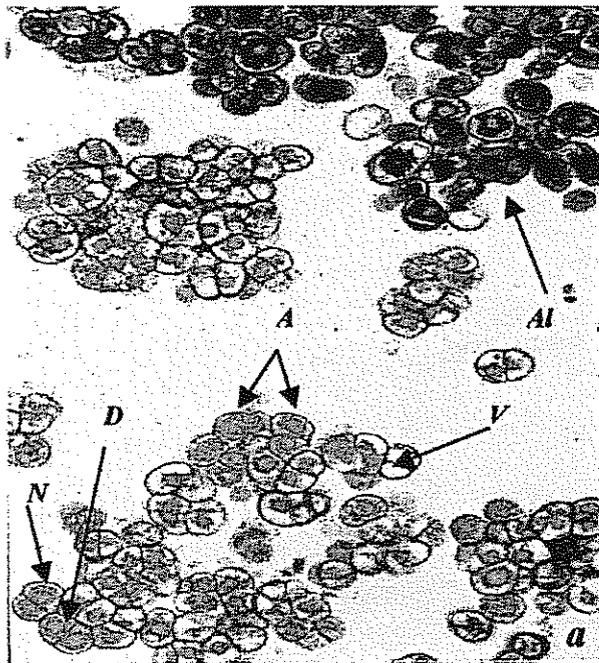


Fig. 18 a). Suspensión celular embriogénica de Gros Michel '3' Testigo (X 20)

A: agregados *V:* vacuolas, *N:* núcleo, *Al:* almidón, *D:* división celular.

b) Suspensión celular criopreservada de Gros Michel '3'(X 20). *P:* plasmolisis.

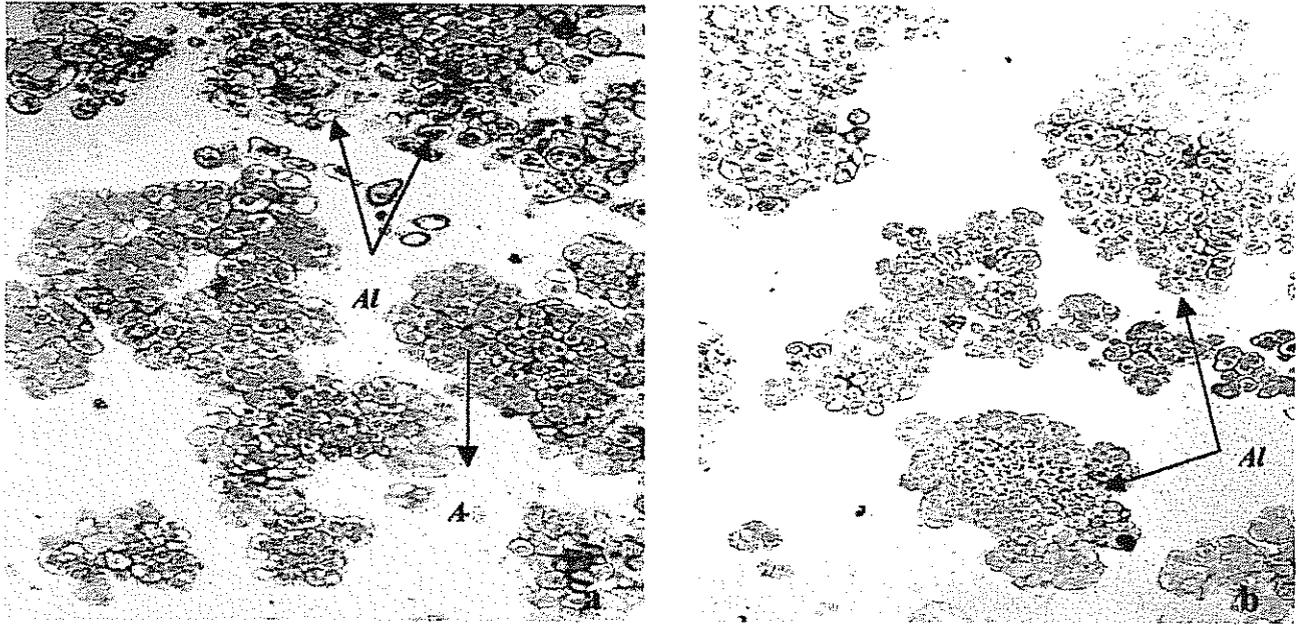


Fig. 19 a). Suspensión celular embriogénica de Curraré '3' Testigo (X10)

A: agregados, *Al:* almidón.

b). Suspensión celular crioconservada de Curraré '3'(X10).

A: almidón.

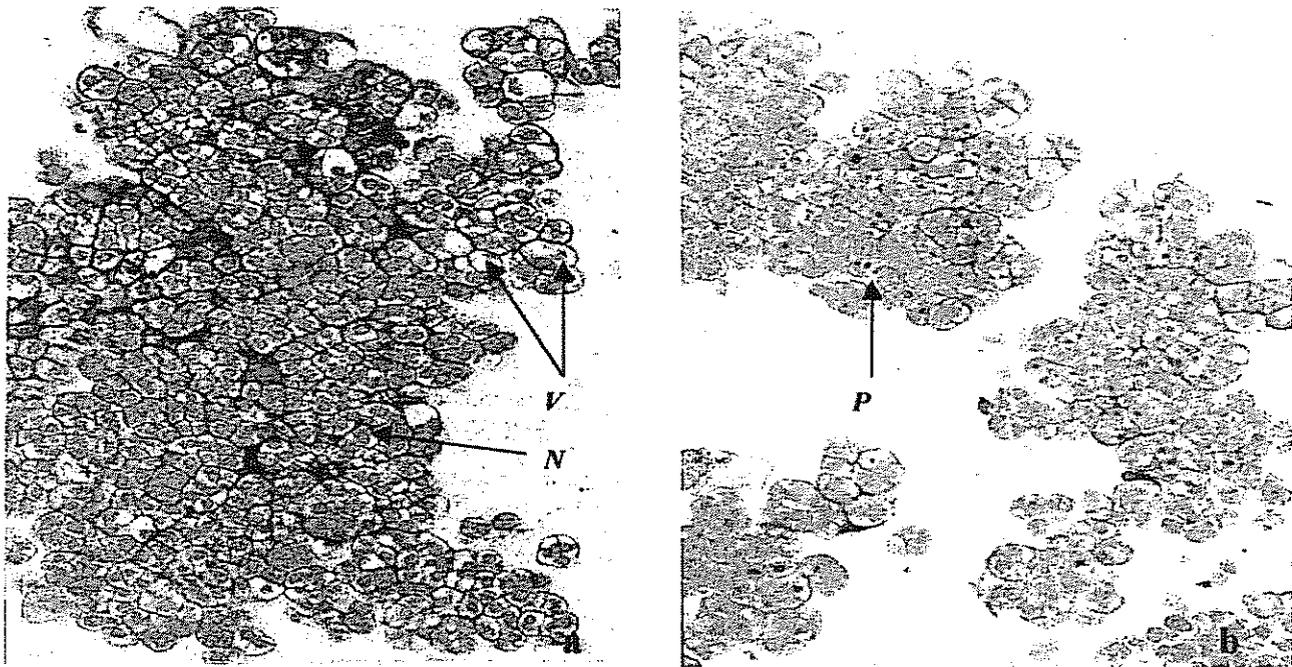


Fig. 20 a). Suspensión celular embriogénica de SF '265' Testigo (X 20)

N: nucleo, *V:* vacuolas.

b). Suspensión celular crioconservada de SF '265' (X 20)

P: plasmolisis.

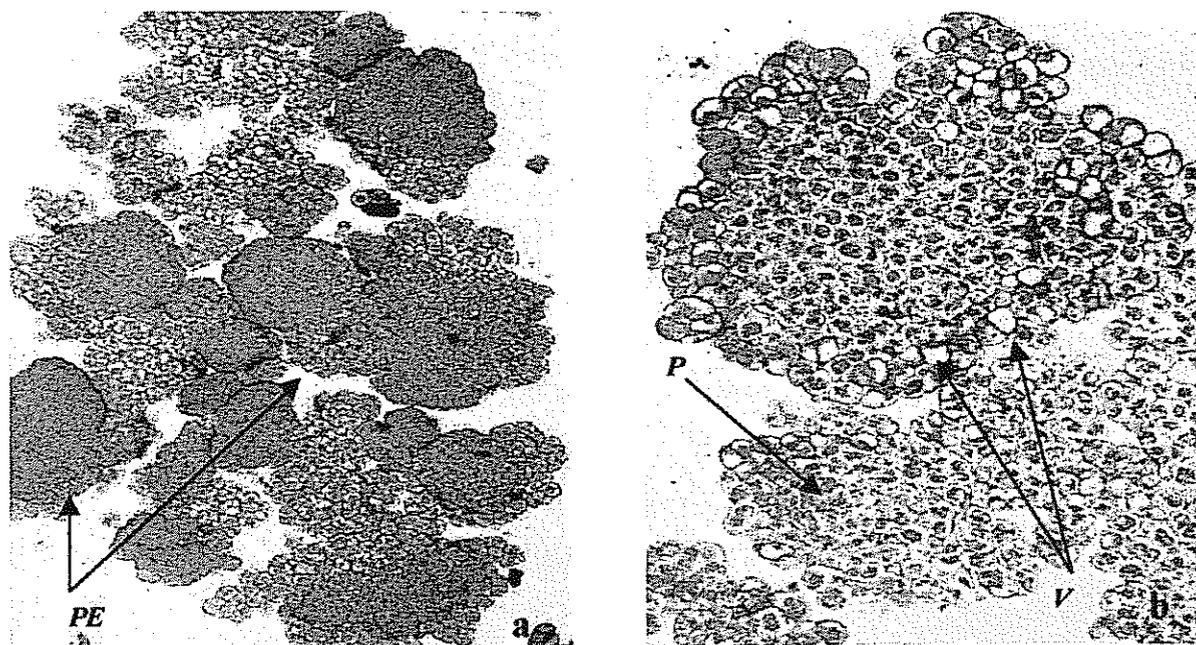


Fig 21 a). Suspensión celular embriogénica de Col '49 2.8' Testigo (X 10)

PE: Proembriones.

b). Suspensión celular criopreservada de Col '49 2.8'(X 20) **V:** vacuolas,

P: plasmólisis.

4.3. Viabilidad de la suspensión celular antes y después de la crioconservación.

¿Es un indicador para medir la eficiencia de la crioconservación?

4.3.1. La influencia de la calidad de la suspensión celular y la capacidad a ser crioconservada.

La determinación de la existencia de ciertas características en las suspensiones celulares que se puedan relacionar con la aptitud a la crioconservación facilitaría los trabajos futuros de investigación. La prueba de fluorescencia con diacetato de fluoresceína (FDA), permitió determinar la viabilidad de la suspensión celular cuantificando la cantidad de células vivas que fluorescen, es decir que permanecen vivas. Se pudo observar que en todos los genotipos estudiados no parece existir una relación entre la viabilidad de las células antes de la crioconservación y la eficiencia de la formación de embriones (Fig. 22).

Sin embargo, observaciones similares se realizaron con suspensiones celulares testigos (sin crioconservación) del cv. Dominico aunque, no parece existir una relación directa (Fig. 23).

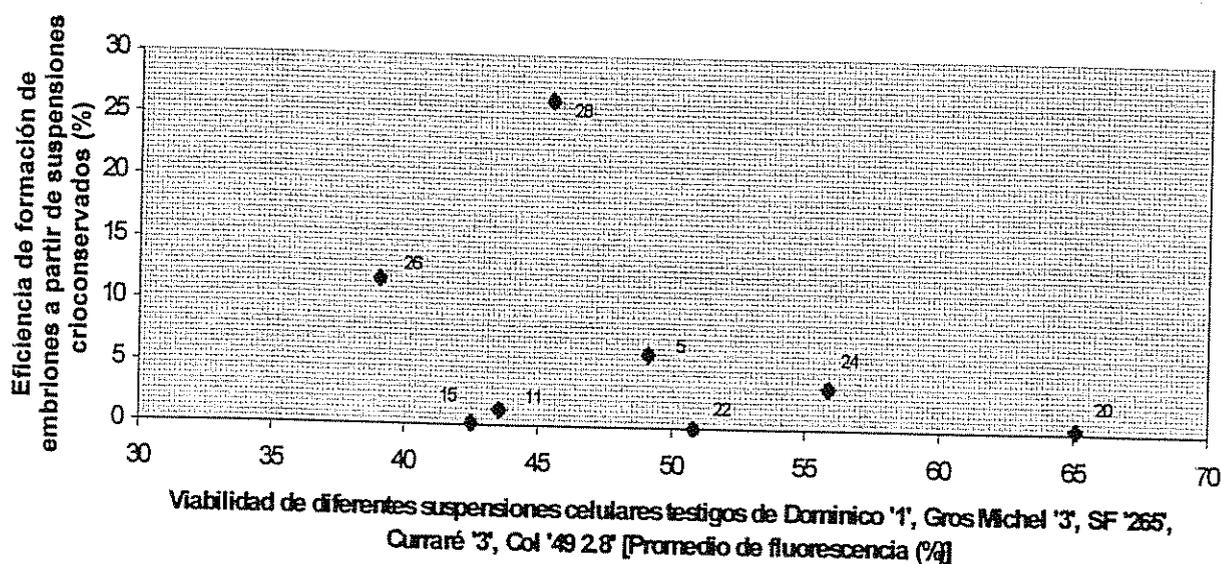


Fig. 22 Relación entre la eficiencia de la formación de embriones a partir de suspensiones celulares crioconservadas de *Musa* spp. y la viabilidad de la misma antes de la crioconservación. Ver descripción de los números (tratamientos) en anexo 2

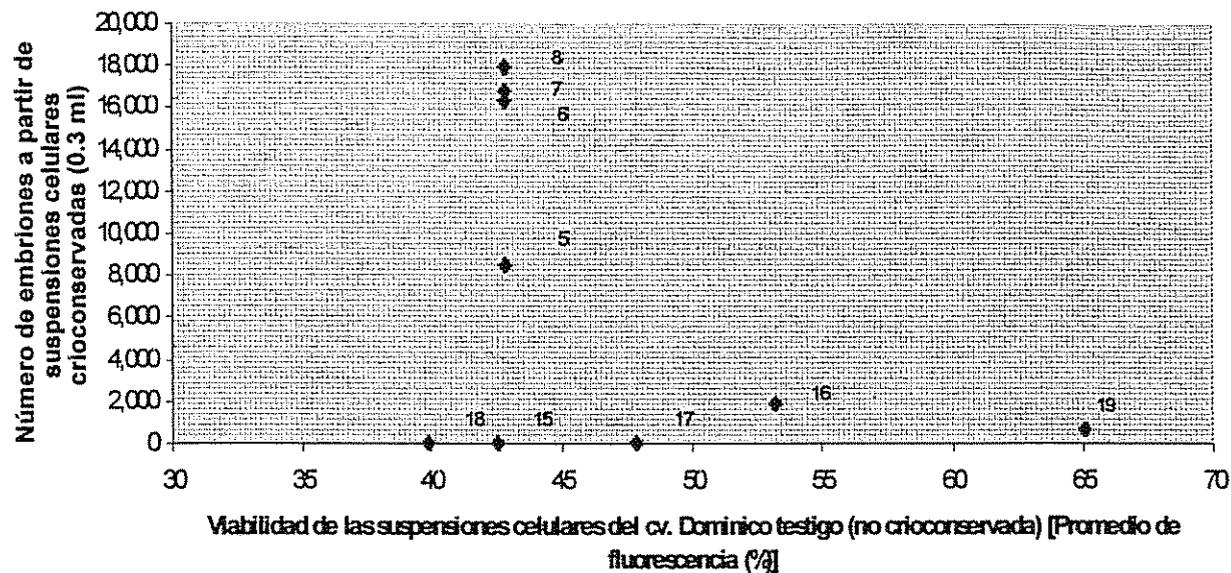


Fig. 23. Relación entre el número de embriones formados a partir de suspensiones celulares y la viabilidad del mismo (no crioconservado) del cv. Dominico (*Musa spp.*). Ver descripción de los números (tratamientos) en anexo2.

Con la finalidad de aclarar el tipo de relación que se obtuvo en las figuras 22 y 23, se realizó una representación gráfica de la viabilidad de las células testigos del cv. Dominico y el número de embriones formados. Los resultados demuestran que la prueba de viabilidad en suspensiones celulares testigos (no crioconservadas) si da una idea de la capacidad de formación de embriones, ya que se observó que mientras mayor es el promedio de viabilidad mayor es la cantidad de embriones formadas (Fig. 24).

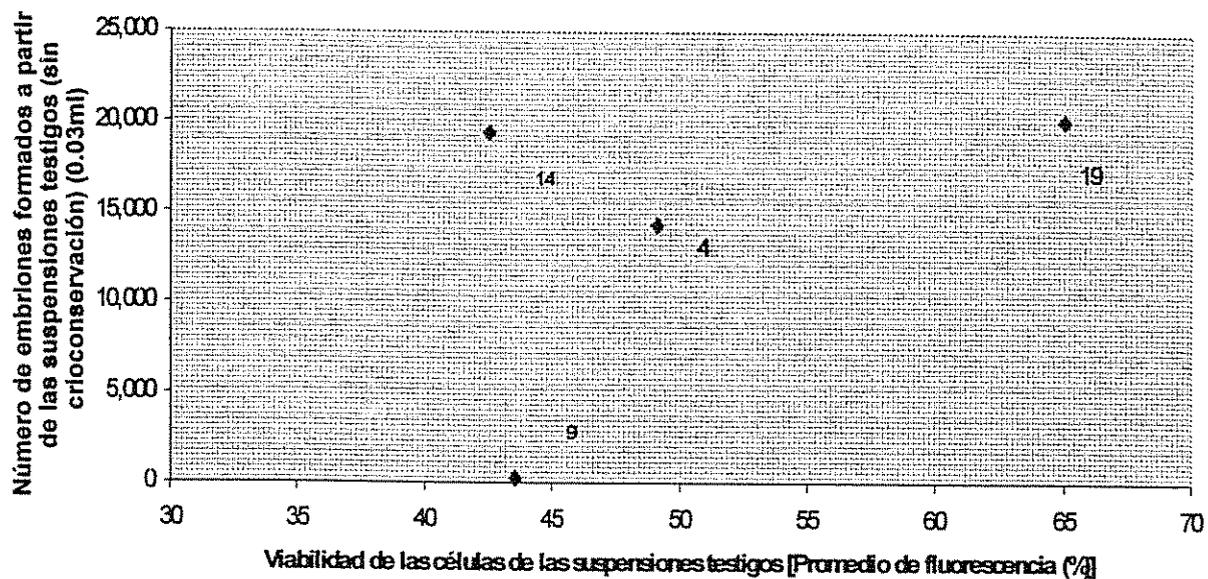


Fig. 24. Relación entre el número de embriones formados a partir de suspensiones celulares testigos (no crioconservada) del cv. Dominico (*Musa spp*) y la viabilidad del mismo antes de la crioconservación. Ver descripción de los números (tratamientos) en anexo 2.

4.3. 2. Utilización de la prueba de FDA para determinar la capacidad de recuperación de suspensiones celulares crioconservadas

La prueba de FDA, realizada 48 horas después de la descongelación tiene como propósito medir la viabilidad de suspensiones celulares crioconservadas. Los resultados obtenidos muestran una tendencia lineal en la eficiencia de formación de embriones (Fig. 25).

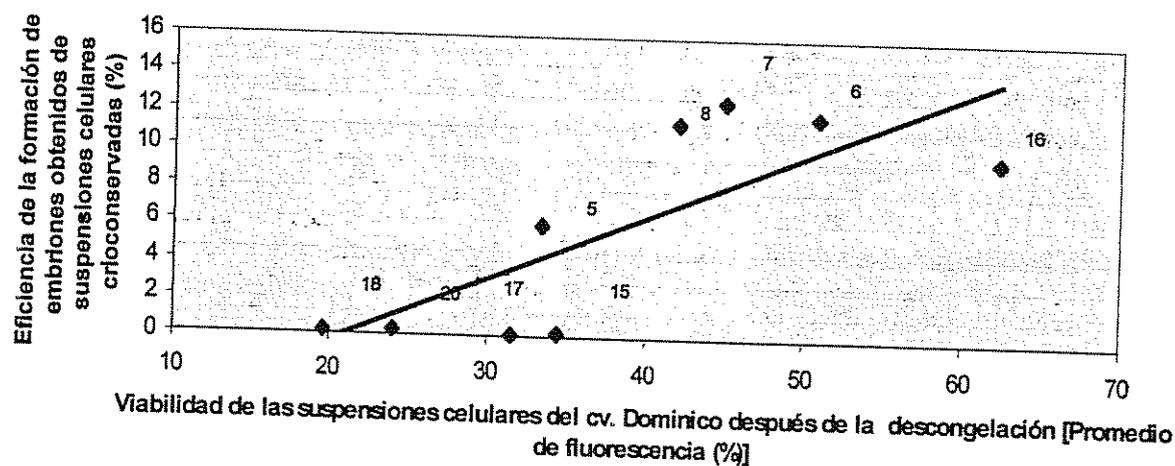


Fig. 25. Relación entre la eficiencia de la formación de embriones a partir de suspensiones celulares del cv. Dominico (*Musa spp.*) y la viabilidad del mismo después de la descongelación. Ver descripción de los números (tratamientos) en anexo 2.

No existe relación entre el incremento relativo del volumen celular y la viabilidad de las células después del congelamiento, aunque hay excepciones como es el caso de los tratamientos 16 y 28 (Fig. 26).

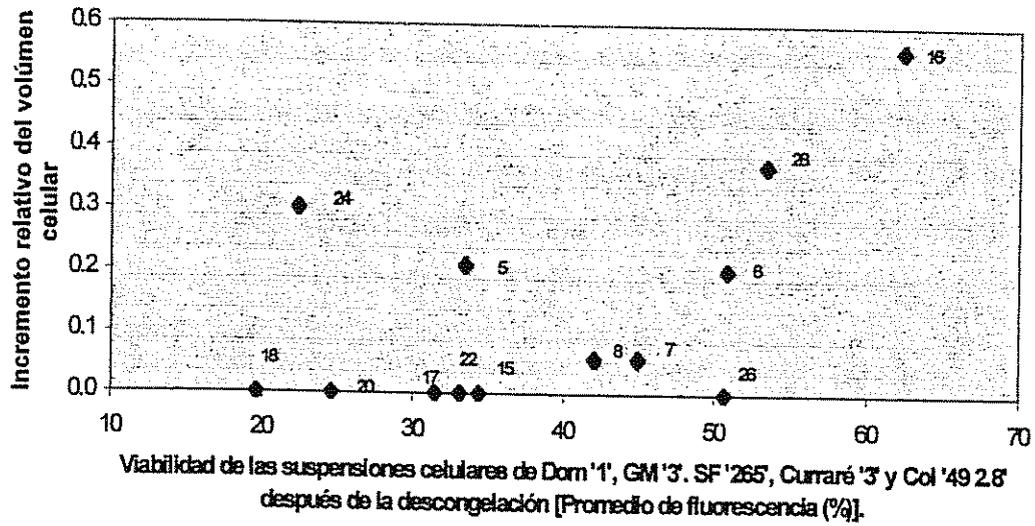


Fig. 26. Relación entre el incremento relativo del volúmen celular y la viabilidad de las suspensiones celulares de *Musa* spp. después de la descongelación. Ver descripción de los números (tratamientos) en anexo 2.

5. DISCUSIÓN

Hasta el momento han sido pocos los trabajos relacionados con el desarrollo de protocolos de crioconservación aplicados a suspensiones celulares embriogénicas en *Musa* (Panis, 1995). Hasta donde se conoce, no existen muchos datos relacionados con la cuantificación de la eficiencia de la metodología de crioconservación (Withers, 1985). El propósito del protocolo de crioconservación utilizado fue para desarrollar una técnica óptima y describir en detalle el efecto de la crioconservación sobre la eficiencia de varias etapas del proceso de regeneración.

5.1. Efecto de varios protocolos de crioconservación sobre la regeneración de suspensiones celulares de *Musa* spp. cv. Dominico

5.1.1. Efecto de la influencia de la inducción a la cristalización, el pretratamiento, la recuperación del material crioconservado y el precultivo.

Los resultados indican que es indispensable realizar la etapa de inducción de la cristalización durante el congelamiento en el cultivar Dominico '1 (Fig. 1)'. Treinta días después de la descongelación, el incremento del volumen celular de este tratamiento fue equivalente al testigo en comparación con el tratamiento sin inducción, en el cual no hubo crecimiento celular y tampoco hubo formación de embriones.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Panis (1990), sobre el hecho que la inducción de la cristalización previene el daño causado por el superenfriamiento, siendo éste por lo tanto un proceso importante para la sobrevivencia de las células crioconservadas de *Musa* spp. Estas mismas observaciones fueron hechas en cítricos (Aguilar *et al.* 1993; Engelmann *et al.* (1994)), en uva (Dussert *et al.* 1991), y en caña de azúcar (Eksomtramage *et al.* 1992). Sin embargo, no todos los protocolos de crioconservación incluyen esta etapa (Withers y Street 1977; Rajasekaran, 1996). Resultados obtenidos por Engelmann *et al.*

(1994), demostraron que la inducción a la cristalización en cítricos no mejora la sobrevivencia del material crioconservado.

La utilización de diferentes niveles de sacarosa durante el pretratamiento, indicó que el uso de una concentración de sacarosa igual o superior a 90 g/l permite la obtención de un crecimiento celular mas alto. Sin embargo, el tratamiento con 180 g/l de sacarosa parece ser sub-óptimo, ya que se observó que la multiplicación celular fue menor que con 135 g/l de sacarosa. Cabe decir, que el análisis de varianza no demuestra diferencias significativas en cuanto al número de embriones producidos en los tratamientos con alta concentración de sacarosa. El mejor porcentaje de germinación se encontró en los tratamientos con 90 y 135 g/l de sacarosa. La eficiencia más alta de la formación de embriones provenientes de suspensiones crioconservadas se obtuvo con los tratamientos de alta concentración de sacarosa (11 y 12%) y solamente 6% para el testigo crioconservado a 45g/l de sacarosa.

Se ha encontrado que durante el pretratamiento, la sacarosa es considerada como un agente deshidratante osmótico (Frinkle *et al.* 1985 y Dumet *et al.* 1993), el cual permite que las células aumenten la tolerancia a la congelación. Esto se debe a que cuando una proporción de agua es eliminada de las células por medio del diferencial osmótico, hay menos disponibilidad de agua libre para la cristalización intracelular de forma tal que el proceso de cristalización sea mas lento en las células. Por lo anterior, sería interesante, verificar si una alta concentración de sacarosa puede sustituir el tratamiento con la inducción a la cristalización.

El ensayo 3, tuvo como objetivo evaluar el efecto de medio líquido o sólido para la recuperación celular después de la descongelación. Se observó que la suspensión celular testigo (no crioconservada) tuvo muy poca formación de embriones, esto hace suponer que el material utilizado consistió de células con una baja capacidad embriogénica. Con base a lo anterior, es difícil decir si la respuesta del medio líquido o sólido se debe a la manera de recuperarse o a la calidad de la suspensión utilizada. Sin embargo, los resultados indican que solamente hubo multiplicación y formación de embriones en las células que pasaron por una etapa previa de medio sólido pero plateadas a una alta densidad (agrupamiento

celular). La eficiencia de esta etapa fue la mas alta (22.6%) pero se debe considerar cuidadosamente este dato debido a la poca formación de embriones en el testigo, lo cual influye sobre el aumento de la eficiencia. Sería muy interesante estudiar el efecto de la concentración de las células en la recuperación del material. También valdría la pena estudiar si la manipulación del material o el contacto directo de las células en el medio sólido influyen en la formación de los embriones.

En cuanto a la recuperación celular en medio líquido, cabe mencionar que no hubo recuperación bajo estas condiciones de cultivo. Entre las posibles causas de este hecho están la occurencia de estrés osmótico (Engelmann, 1991) o bien que el medio líquido haya eliminado los sólutos vitales (Withers y King 1979). El lavado de los crioprotectantes después de la descongelación ha demostrado ser muy dañino para algunas especies (Rajaskaran, 1996; Gnanapragasam y Vasil, 1990, 1992). Sin embargo, Withers y King (1979, 1980); Aguilar *et al.* (1993); Kuriyama *et al.* (1990), demostraron que la recuperación en medio solido es más efectiva que las que se realizan en medio líquido.

En el ensayo de precultivo, se obtuvo un aumento considerable del recrecimiento celular con un precultivo de 7 días con 135 g/l de sacarosa. Sin embargo, el crecimiento celular fue dos veces menor que el testigo (no crioconservado). La suspensión celular del testigo (sin crioconservación) tuvo muy poca formación de embriones, lo cual hace suponer que la calidad de la suspensión fue similar a la utilizada en el ensayo anterior. Esto puede ser la razón por la cual el tratamiento con 45 g/l de sacarosa (testigo crioconservado), no tuvo recrecimiento ni formación de embriones. Por lo anterior, sería necesario verificar este comportamiento realizando los ensayos nuevamente con suspensiones celulares mas homogéneas.

Panis (1995), demostró el éxito de la técnica del precultivo en cinco cultivares de *Musa*, otorgando tasas de sobrevivencia de 6 a 42.5%. Según Engelmann (1998), la modificación de la concentración de sacarosa y la duración del precultivo debe mejorar la tasa de sobrevivencia. La realización del precultivo permite la disminución del nivel de agua en

los tejidos, y por lo tanto, disminuye la formación de cristales intracelulares en los tejidos (Dumet, 1993).

La eficiencia de los diferentes protocolos de crioconservación realizadas con cv. Dominico (*Musa spp.*), se presentó en un rango de 0 a 22.6%. Las observaciones y datos obtenidos demuestran que es indispensable realizar la inducción de la cristalización (11.9% de eficiencia) y la recuperación celular en medio sólido pero a alta densidad (agrupamiento celular) (22.6% de eficiencia). Sin embargo, en este último, es difícil asegurar una alta eficiencia debido a la baja cantidad de embriones formados en el testigo (no crioconservado). También la utilización de sacarosa durante el pretratamiento y precultivo mejora la eficiencia de la formación de embriones de 11.8% a 12.6% cuando aumenta la concentración de 90 a 135 g/l de sacarosa.

El tipo de cuantificación que se usó para calcular la eficiencia de la crioconservación es interesante de aplicar aunque tiene la limitación, que no permite hacer comparaciones estrictas con el porcentaje de recuperación de los tratamientos, ya que esto implicaría trabajar con el mismo testigo (el mismo día) para poder comparar el efecto.

5.1.2. Aplicación del protocolo modificado con varios genotipos de *Musa spp.*

La tasa de recuperación celular de los diferentes cultivares analizados varió considerablemente. Solamente los cultivares SF '265' y Col '49 2.8' muestran multiplicación celular después de la descongelación. Esto probablemente se debe a que la cantidad de células que sobrevivieron en los demás cultivares fue reducida, o que quizás las células muertas producen compuestos tóxicos, los cuales afecta a las células vivas. Casi todas las suspensiones celulares de los diferentes cultivares formaron embriones después de crioconservación y regeneraron plantas con la excepción de Gros Michel '3' (GM3), el cual reaccionó negativamente a la crioconservación.

La relación de las características histológicas de la suspensión celular con referencia a su aptitud a ser crioconservada, depende de la presencia de gran cantidad de agregados embriogénicos, células pequeñas con alto contenido citoplasmático, pocas vacuolas, ausencia de granos de almidón. Estas características permiten que las células tengan resistencia a la congelación, debido al bajo contenido de agua que presentan. Estos mismos resultados han sido encontrados por Panis *et al.* (1994b) y Aguilar *et al.* (1993). El cultivar Col '29 2.8' fue el que obtuvo el mayor porcentaje de eficiencia de formación de embriones (26%), pero este valor debe ser considerado único ya que el número de embriones formados en el testigo fue más bajo al compararlo con el resto de los cultivares, por este motivo se tuvo una gran influencia al calcular la eficiencia de la formación de embriones. Es necesario aclarar, que este cultivar fue completamente diferente a los demás genotipos, es decir, la suspensión celular estaba constituido de 90% de proembriones (Fig. 22). Es por este motivo, que la comparación estrecha de este porcentaje de eficiencia con los demás porcentajes de eficiencia de los demás cultivares no es posible realizarla directamente. En el trabajo realizado por Panis *et al.* (1995), con varios genotipos de *Musa* se encontró que la suspensión celular (cv. Bluggoe '9') la cual estaba compuesta de embriones somáticos en estado globular no sobrevivió después de la crioconservación. Sin embargo, el presente trabajo demostró que se puede crioconservar eficientemente suspensiones celulares constituidas de proembriones.

5.2. Características de las etapas de la regeneración relacionada con la eficiencia de la crioconservación.

Al parecer, la eficiencia de la crioconservación, esta directamente relacionada con el incremento relativo del volumen celular después de la descongelación. La eficiencia de formación de embriones de 10-15 % tuvo un incremento celular entre 1.4 y 2.5 ml. (SCV) (Fig. 26), sin embargo hay excepciones, como por ejemplo, el cultivar Curraré 3, el cual mantuvo la capacidad para formar embriones después de la crioconservación, pero no logró recuperarse y multiplicar células. También el cultivar Col '49 2.8', aunque tuvo el mayor porcentaje de eficiencia de la crioconservación (26%) presento a la vez un menor incremento celular que los demás tratamientos. Es por este hecho, que sería válido realizar un ensayo para determinar si la multiplicación celular ésta relacionada con el tiempo de recuperación en medio sólido o con el tipo de medio de recuperación.

Igualmente parece existir una relación entre la eficiencia de la formación de embriones y el porcentaje de germinación, con la excepción de Col '49 2.8'. Sin embargo, se demostró que este resultado no es particular de la crioconservación ya que también las células no crioconservadas mantienen la misma relación (Fig. 16). Posiblemente, lo que esto indica es que a una densidad apropiada, las células tienen la capacidad de formar embriones con óptimo desarrollo, lo que permite que los embriones tengan un alto potencial de germinación. Otra razón, podría ser que cuando hay un menor número de embriones, esto puede estar relacionado con la presencia de células que no tienen esa capacidad de formar embriones y como consecuencia, estas mismas se oxidan y dañan a los demás embriones. En cualquier caso, este resultado sugiere que lo que posiblemente ocurre no es un efecto trófico (competencia entre embriones), sino un efecto de toxicidad. Es por estos motivos, que debería realizarse pruebas bioquímicas (por ejemplo la relación entre la presencia de polifenol en la caja petri y la tasa de germinación) para comprobar estas hipótesis.

Las diferencias observadas en la intensidad de la multiplicación celular y la formación de embriones están posiblemente están en parte relacionadas, con el grado de daño que sufrieron las células en las diferentes etapas de la crioconservación. La morfología de las

células, particularmente el tamaño celular y la presencia de vacuolas influyen grandemente en la sobrevivencia celular después de la crioconservación. Los estudios histológicos realizados después de la descongelación, revelaron que todas las suspensiones crioconservadas mostraron algún nivel de daño, es decir, plasmolisis del núcleo o en el citoplasma (Fig. 17b, 18b, 19b, 20b, 21b). Sin embargo, se observó que la mayoría de las células que presentaban una parte de la estructura intacta son las que tenían características embriogénicas (Dominico '1', Curraré '3' y SF'265') y presencia de proembriones (Col '49 2.8') (Fig. 21a). El genotipo Col '49 28', a pesar de no presentar una alta eficiencia en cuanto al crecimiento celular, número de embriones y porcentaje de germinación, si tuvo un efecto importante el manifestar la máxima eficiencia de formación de embriones (26%), pero como se mencionó anteriormente, esta eficiencia no es posible compararla con los demás cultivares (Fig. 13). Este resultado fue contrario al obtenido por Aguilar *et al.* (1993), en el caso cuando las células proembrionarias se diferenciaron y perdieron las características meristemáticas después de permanecer mucho tiempo en medio sólido después de la descongelación,. En el caso del cultivar Gros Michel '3', constituido de agregados de diferentes tamaños (Fig. 18 a y b), no logró recuperarse, debido posiblemente a la presencia de agregados pequeños, y a la calidad de la suspensión celular. Se ha encontrado que hay una relación inversa entre el tamaño de las células y la capacidad de sobrevivencia después de la congelación (Withers y Street, 1977). La presencia de grandes vacuolas conteniendo granos de almidón de considerable tamaño influyen en la resistencia celular durante la congelación (Panis *et al.* 1995).

5.3. Determinación de la viabilidad de la suspensión celular antes y después de la criopreservación. ¿Es un indicador para medir la eficiencia de la criopreservación?

Los resultados mostraron que la realización de la prueba de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA), antes de la criopreservación (testigo) no es un buen indicador para medir la eficiencia de la criopreservación (Fig. 23). El motivo puede deberse a que las diferentes etapas de la criopreservación (desde la etapa del pretratamiento con DMSO y sacarosa, hasta la etapa de la recuperación del material), son etapas que influyen de gran manera para la sobrevivencia celular. Tal vez por esta razón, cuando se suman todos los efectos de daño en las diferentes etapas, suele ser difícil determinar si habrá recuperación o no. No parece existir una relación estrecha entre la estimación de la viabilidad con FDA antes de la congelación y el número de embriones obtenidos (Fig. 24).

La realización de la prueba de FDA, 48 horas después de la descongelación, si parece ser un indicador para medir la eficiencia del protocolo de criopreservación (Fig. 26). La razón podría ser que a ese lapso de tiempo, el dato de fluorescencia es más preciso, ya que la lectura proviene de células que sobrevivieron todas las etapas de la criopreservación. Además la criopreservación hace una selección de las células más aptas a la embriogénesis. Es por eso que la prueba de viabilidad con FDA después de la descongelación tiene gran utilidad para determinar rápidamente si el protocolo utilizado fue eficiente o no. Por lo contrario, Sala *et al.* (1978) y Dussert *et al.* (1991) encontraron que esta prueba a pesar de ser precisa para medir la viabilidad no da información de la duración de la sobrevivencia y por lo tanto del potencial de recuperación y regeneración. También Withers, (1985), agrega que la prueba de FDA es un buen indicador de viabilidad celular inmediatamente después de la criopreservación, pero ésta no debe ser tomada como señal de la capacidad del recambio celular. Si bien una sola estimación puede ser adecuada, el monitoreo de los cambios de viabilidad en un período de tiempo es más preciso, ya que esto indica con precisión el progreso del comportamiento celular (muere o sobrevive) (Withers y King 1980).

6. CONCLUSIÓN

Con el objetivo de mejorar la metodología de crioconservación, se plantearon tres preguntas:

- 1) ¿Será que es posible mejorar la eficiencia de la crioconservación de suspensiones celulares de *Musa* modificando algunas de las etapas del protocolo existente de crioconservación?
- 2) ¿Cuáles son las características de la regeneración que se relacionan con la cuantificación de la eficiencia de la crioconservación?
- 3) ¿Será que la prueba con diacetato de fluoresceína (FDA), puede ser un indicador para determinar la capacidad de la suspensión celular a ser crioconservada?

Con base a los resultados obtenidos se concluye:

- 1) Los tratamientos de crioconservación que fueron más eficientes son:
 - a) La inducción de la cristalización,
 - b) La crioprotección con altos niveles de sacarosa,
 - c) La recuperación de las células a alta densidad (agrupamiento celular).
- 2) Se determinó la eficiencia de la crioconservación calculada con base a la relación $\text{No. de embriones de células crioconservadas} / \text{No. de embriones de células no crioconservadas}$. Esta relación varió de 0 hasta 26%.
- 3) Las características de regeneración que parecen tener relación con la eficiencia de la crioconservación son:
 - a) El incremento relativo del volúmen celular,
 - b) El porcentaje de germinación y

- c) Las características específicas de las suspensiones celulares como la presencia de agregados meristemáticos embriogénicos y la presencia de proembriones.
- 4) Los resultados de la prueba de viabilidad con diacetato de fluoresceína antes de la criopreservación no parecen estar relacionados con la capacidad de formación de embriones después de la criopreservación, es por lo anterior que no se puede utilizar como indicador para determinar la eficiencia de la metodología de criopreservación.
- 5) Los resultados obtenidos de la prueba de viabilidad con diacetato de fluoresceína después de la criopreservación (48 horas después de la descongelación) indican que esta prueba relacionada con el incremento relativo del volumen celular después de la criopreservación, por lo tanto si puede ser un buen indicador para determinar la eficiencia de la metodología de criopreservación..

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuras investigaciones varios niveles de estudios:

En primera instancia, se debería realizar nuevamente los ensayos donde se obtuvo una alta eficiencia de la crioconservación (pero el mismo día para que de este modo se utilice la misma calidad de la suspensión celular), para de esta manera poder profundizar estas etapas del protocolo de crioconservación. Los estudios mas importantes de continuar son aquellos relacionados con el pretratamiento de sacarosa y el efecto de la densidad de las células para la regeneración.

Este estudio constituye el primer paso para desarrollar una metodología de cuantificación de la eficiencia de la crioconservación con base a la formación de embriones. Es por esta razón, que se debería seguir trabajando con un desarrollo más detallado para la cuantificación de la eficiencia de la crioconservación. Sin embargo, para poder comparar los tratamientos sería interesante seguir trabajando para mejorar el sistema de cuantificación tratando de incluir las otras etapas de la regeneración en la evaluación de la eficiencia de la crioconservación.

Por ultimo, se recomienda estudiar con mas detalle los mecanismos que influyen en la crioconservación de *Musa* como por ejemplo: la ultraestructura celular con microscopía electrónica, la relación entre el contenido de agua y la resistencia de las células a la congelación, el de nivel de ploidía de los genotipos utilizados y el nivel de oxidación de las células después de la crioconservación. Una vez realizado lo anterior, se recomienda difundir el modelo de cuantificación a otros laboratorios para que pueda ser implementado en otros estudios de crioconservación.

8. LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR, A.; MORA, A.; VILLALOBOS, V. 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *M. balbisiana* (BB). *Cryo-lett.* 13: 159-164.
- ABDELNOUR A, ESCALANT J.V. 1994. Cryopreservation of somatic embryos of *Musa grand naine* (AAA). In: proceedings of the XI meeting at ACORBAT, San José. Costa Rica, 13-18 February 1994.
- ASHWOOD- SMITH, M.J.; FREIDMANN, G.N. 1979. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196 °C in demethylsulfoxide. *Cryobiology* 16; 132-140.
- AGUILAR, M.E.; ENGELMAN, F.; MICHAUX-FERRIERE, N. 1993. Cryopreservation of cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. and Histological study. *Cryo-lett.* 14: 217-228.
- BAJAJ, Y.P.S. 1983. Cryopreservation and International Exchange of Germplasm. *In Plant Cell Cultures in Crop Improvement*. Sen, K.S.; Giles, K.L.(eds.) *Plant Life Science* 22: 19-41.
- BENSON, E.E.; WITHERS, L.A. 1987. Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures: a non- destructive method for assessing stability. *Cryo-Lett.* 8 : 35-46.
- BENSON, E.E.; HARDING, K. ; SMITH, H. 1989. Variation in recovery of cryopreserved shoot tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre and post-freeze light regimes. *Cryo-lett.* 10 : 323-344.

- CÔTE, F.X.; DOMERGUE, R.; MONMARSON, S.; SCHWENDIMAN, J.; TEISSON, C. ; ESCALANT, J.V. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiology Plantaruum* 97: 285-290.
- DHED'A, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bloggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46(2): 125- 135.
- DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports* 12:352-355.
- DUSSERT, S.; MAURO, M.C.; DELOIRE, A.; HAMON, S.; ENGELMANN, F. 1991. Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions: influence of pretreatment, freezing and thawing conditions. *Cryo- Lett.* 12: 287-289.
- ENGELMANN, F. ; DUVAL, Y ; DEREUDDRE, J. 1985. Survival and proliferation of oil Palm (*Elaeis quinensis* Jacq.) somatic embryos after freezing in liquid nitrogen. *C.R. Acad. Sc. Paris (serie III)*, 301(3) : 11-116.
- ENGELMANN, F. 1991. *In vitro* Conservation of tropical plant germplasma-a review. *Euphytica* 57 : 227-243.
- ENGELMANN, F.; DAMBEIR, D.; OLLITRAULT, P. 1994. Cryopreservation of Cell Suspensions and Embryogenica Callus of *Citrus* Using a Simplified Freezing Process. *Cryoletter* 15: 53-58.
- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. ; CÔTE, F. 1994. Amplified Somatic Embryogenesis from Male Flower of Triploid Banana and Plantain Cultivars (*Musa* spp.). *In vitro Cell. Dev. Biol.* 30P:181-186.

- EKSOMTRAMAGE, T.; PAULET, E.; GUIDERDONI, E.; GLASZMANN, J.C.; ENGELMANN, F. 1992. Development of a Cryopreservation Process for Embryogenic Calluses of a Commercial Hybrid of Sugar Cane (*Saccharum* spp.) and Application to different varieties. *Cryo-letters* 13: 239-252.
- FRINKLE, B.J.; ZAVILA, M.E.; ULRICH, J.M. 1985. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. *In* Kartha K.K. (ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRC Press, Boca Raton 75-113 pp.
- GNANAPRAGASAM, S.; VASIL, I.K. 1990. Plant Regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension culture of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* spp.). *Plant Cell Report* 9: 419-423.
- GNANAPRAGASAM, S.; VASIL, I.K. 1992. Cryopreservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science* 83: 205-215.
- GRAPIN, A.; SCHWENDIMAN; TEISSON, C. 1996. Somatic Embryogenesis in Plantain Banana. *In Vitro Cell Development Biology-plant* 32:666-71.
- GRAPIN, A.; ORTIZ, J.L.; DOMERGUE, R.; MONMARSON, S.; ESALANT, J.V.; TEISSON, C.; CÔTE, F. 1998. Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flowers of *Musa*. *In* The international Magazine on Banana and Plantain (INFOMUSA). 7:1. 13-15 p.
- HABERLANT, G. 1902. Experiments on the Culture of Isolated Plant cell. *In* Banana and Plantain Breeding Strategies. Proceedings of an International workshop. 13-17 Oct. 1986. Perseley, G.J. and De Langhe, E.A.(eds.). Australia. 69-85p.

- HAWKES, J.G. 1981. Germplasm collection, preservation and use. *In* Frey, K.J. (ed.). Plant breeding ; II. Iowa State University Press, Ames, Iowa, E.U. 57-83 pp.
- INIBAB, 1996. Valorizar los bananos y plátanos :El Role de la Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano. Montpellier, Francia. 15 p.
- KARTHA, K.K. 1982. Cryopreservation of plant meristem : a novel approach for the preservation of germplasm in disease and free condition. *In*: a Fujiwara (ed. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo : 795-796.
- KURIYAMA, A.; WATANABE, K.; UENO, S. MITSUDA, H. 1990. Effect of Post Thaw treatment on the viability of cryopreserved *Lavandula vera* Cells. *Cryoletters* 11-171-178.
- LANGIS, R.; STEPONKUS, P. 1990. Cryopreservation of Rye protoplast by vitrification. *Plant Physiology* 92: 666-671.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. *In* Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 970 p.
- LYNDSE, Y A. W.; STREET, H.E. 1977. Freeze Preservation of Cultured Plant Cells: III The Pregrowth Phase. *Physiol. plant.* 39: 171-178.
- LYNDSE, Y A. W. TOPPING, J.F. 1993. Embryogenesis: a question of pattern. *Journal of Experimental Botany.* 44(259): 359: 374.
- MA, S.S. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture in banana. Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops. Taipei, Taiwan held in 8-9th march, 1988. National Taiwan University. 181-188p.

- MANUAL DE PRACTIQUE D'HISTOLOG'IE VEGETALE. 1989. Laboratoire de cytogenetique et d'histologie vegetale. CIRAD, Francia.
- MARIN, M.L.; DURAN, V. 1988. Survival of somatic embryos and recovery of plant of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) after immersion in liquid nitrogen. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 14 : 51-57
- MARROQUIN, C.G.; PADUSCHECK, C.; ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro cell. Dev. Biol.* 29:43-46.
- MERYMAN, H.T. ; WILLIAMS, R.J. 1985. Basic principles of freezing injury to plant cell. Natural tolerance and approaches to cryopreservation *In* Kartha, K.K (ed.) *Cryopreservation of Plant Cells and Organs* CRC Press, Boca Raton 13-49 pp.
- MORA A, ABDELNOUR A, VILLALOBOS V. 1991. Cryopreservation of zygotic embryo of *Musa*. *Proceedings of the Fourth Conference of the International Plant Biotechnology Network (IPBNet)*, San José, Costa Rica, January 14-18, 1991. p 81.
- MROGINSKI, L.A.; ROCA W.M.; KARTHA, K.K. 1991. Crioconservación del germoplama. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. 172-208p.
- NOVAK, F. J. 1992. *Musa* (bananas and plantains). *In* *Biotechnology of Perennial Fruit Crops* F.A. Hammerschlag and R.E. Litz. (eds.) 449-448. Cab International, Wallingford. ISBN 0-851-98708-7.
- NOVAK, F.J. AFZA, R, VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M. CONGER, B.V.; XIAOLANG, T. 1989. Somatic Embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.) *Bio/Tech.* 7: 154-159.

- OCHOA, N. 1985. Conservación de germoplasma. *In* Fundamentos teoricos-practicos de cultivo de tejidos vegetales. V. Villalobos (ed.). México. 126-135p.
- PANIS, B.J.; WITHER, L.A.; DE LANGHE, E.A.L. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *Cryo-lett.* 11: 337-350.
- PANIS, B, 1995. Cryopreservatie van bananameristemen. Thesis. Catholic University Leuven, Belgium. 119.
- PANIS, B. SWENNEN R 1994B. Cryopreservation of banana germoplasm. *In* Bajaj YPS(ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 32, Cryopreservation of plant germplasm. Springer- Verlag, Berlin) 381-395pp.
- PANIS B. DHED'A, D, SWEENEN R. 1992b. Freeze preservation of embryogenic *Musa* suspension cultures. *In* Adams R.P, Adams JE.(eds.). Conservation of plant genes: DNA banking and *in vitro* biotechnology. Academic Press, San Diego, California pp. 183-195.
- PANIS, B.; TOTTE, N.; VAN NIMMEN, K.; WITHERS, L.A.; SWENNEN, R.; 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Science* 121: 95-106.
- PRADO, M.I. 1991. Criopreservación de callos de ssp. *Malaccensis Musa* Gran Enano (AAA), y *Musa Acuminata* (AA). Tesis Magister Scientiae, CATIE. Turrialba, Costa Rica. 69 p.
- RAJASEKARAN, K. 1996. Regeneration of plants from cryopreserved embryogenic cell suspension and callus cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Plant Cell Reports* 15 : 859-864.

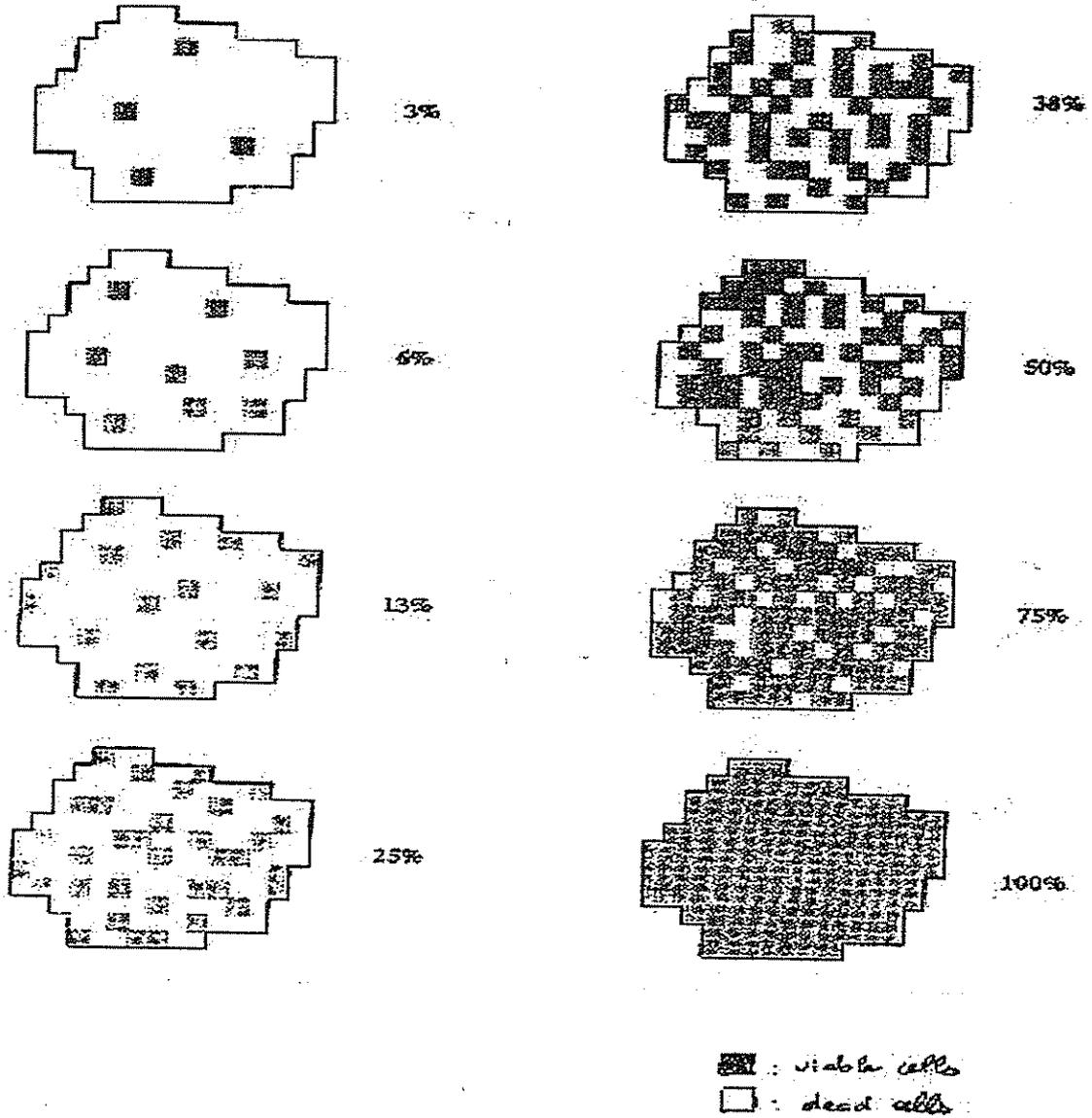
- RANGASWAMY, N.S. 1986. Somatic Embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.). Vol. 96, No.4. 247-277.
- SALA, F.; CELLA, R.; ROLLO, F. 1979. Freeze Preservation of Rice Cells Grown in Suspension Cultures. Physiol. Plant. 45: 170-176.
- SANDOVAL, J. ; MULLER L. 1989. Consideraciones sobre la conservación *in vitro* de Musáceas : posibilidades y limitaciones. *In* Revista de la Asociación Bananera Nacional (ASBANA). 13 : 21-24.
- SAS INSTITUTE, 1988. Sas/Stat user's guide, release 6.03 edition. Cary, NC. SAS Institute Inc. 1028 p.
- SHARROK, S. 1989. Collecting *Musa* germoplasm. *In Musa* conservation and documentation. Proceedings of a workshop held in Belgium, 11-14 Dic 1989. INIBAP/IBPGR. Montpellier, France 53-56p.
- SOTO, M. 1990. Bananos : cultivo y comercialización. 2 ed. San José, Costa Rica. Litografía e Imprenta Lil. 627 p.
- STOVER, R.H. ; SIMMONDS, N.W. 1989. Bananas. 3 ed. Longman, Singapore Publishers. 468 p.
- SUGAWARA, Y.; SAKAI, A. 1974. Survival of suspension cultures Sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. Plant Physiol. 54: 722-724.
- SZABADOS, L. ; MROGINSKI, L.A. ; ROCA, W.M. 1991. Suspensiones celulares : descripción. manipulación y aplicaciones. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura : fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. 172-208p.

- VILLALOBOS, V.M.; ABDELNOUR, A. 1992. Cryopreservation of *Musa* spp. and its potential for long term storage of other tropical crops. *In Conservation of Plant Genes*. Adams, R ; Adams, E. (eds.). Academic Press Inc. 197-210.
- WIDHOLM, J.M. 1977. The use of Fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plants cells. *Stain Technol.* 47 : 189-194.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. 1986. Somatic Embryogenesis : factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57 :443-462.
- WITHERS, L.A. ; STREET, H.E. 1977. The freeze Preservation of plant Cell Cultures. *In Proceeding in Life Sciences Plant Tissue Cultures and Its Biotechnological Application*. Ed. Barz, W ; Reinhard, E. ; Zenk, M.H. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 226- 244p.
- WITHERS, L.A. 1979. Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota*). *Plant Phisiol.* 63 : 460-467.
- WITHERS, L.A.; KING, P.K. 1979. Proline: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Cultured Cells of *Zea Mays* L: *Plant Physiology*. 64: 675-678.
- WITHERS, L.A.; KING, P.K. 1980. A simple freezing unit and routine cryopreservation methods for plant cell cultures. *Cry-Letters* 1: 213-220.
- WITHERS L.A. 1985. Cryopreservation of cultures Plant Cell and Protoplasts *In* Kartha K.K. (ed). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRC Press, Boca Raton 243-267 pp.

WITHERS, L.A.; ENGELMANN, F. 1998. In vitro Conservation of Plant Genetic Resources. *In Agricultural Biotechnology*. (Ed) Altman, A. New York- Basel- Hong Kong. 57-88 p.

9. ANEXOS

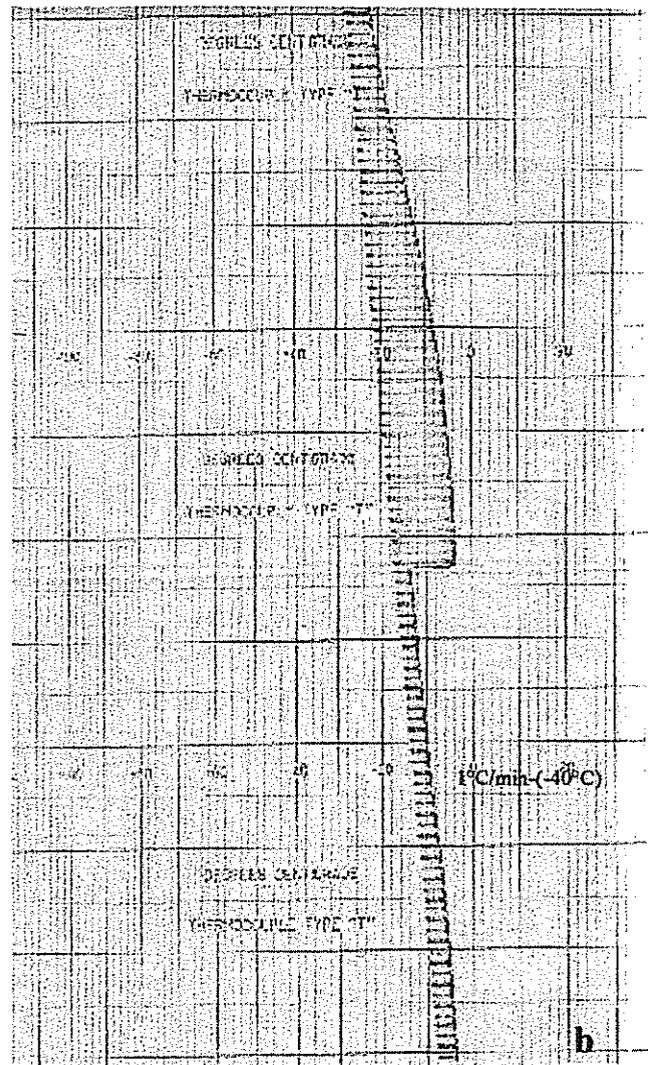
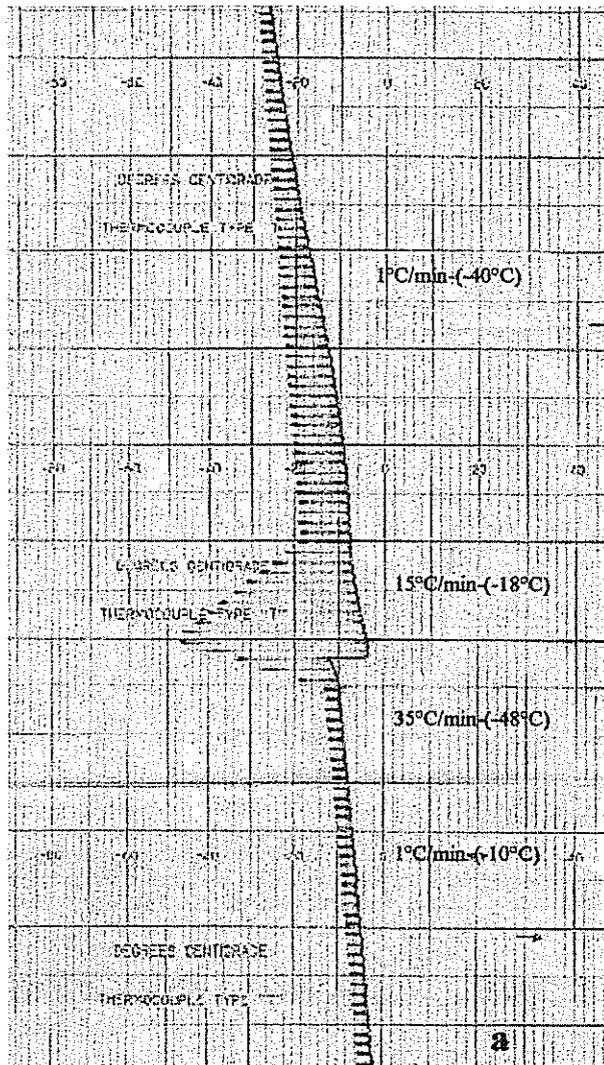
Anexo 1. Tabla de referencia para determinar la viabilidad de las suspensiones celulares con FDA.



Anexo 2. Descripción de los ensayos de crioconservación de suspensiones celulares de *Musa* spp., CATIE, 1998.

Número	Tratamientos
Ensayo 1	
1	Testigo cv. Dominico
2	Con inducción a la cristalización
3	Sin induccion a la cristalización
Ensayo 2	
4	Testigo cv. Dominico
5	5 g/l de sacarosa
6	45 g/l de sacarosa
7	135 g/l de sacarosa
8	180 g/l de sacarosa
Ensayo 3	
9	Testigo cv. Dominico
10	Distribución central (alta densidad)
11	Distribución dispersa (baja densidad)
12	Ma2 liquido (medio líquido)
13	Ma2 liquido +3% de DMSO
Ensayo 4	
14	Testigo cv. Dominico
15	45 g/l de sacarosa
16	135 g/l de sacarosa
17	10 g/l de lactosa (1 día)
18	10 g/l de lactosa (7 días)
Ensayo 5	
19	Dominico '1' Testigo
20	Dominico '1' Crioconservado
21	Gros Michel '3' Testigo
22	Gros Michel '3' Crioconservado
23	SF '265' Testigo
24	SF '265' Crioconservado
25	Curraré '3' Testigo
26	Curraré '3' Crioconservado
27	Col '48 2,8 Testigo
28	Col 49 '2,8' Crioconservado

Anexo 3. Gráfica representando las corridas de los programas del congelamiento. a) con inducción de la cristalización, b) sin inducción de la cristalización.



Anexo 4. Análisis estadístico utilizado para la crioconservación de suspensiones celulares de *Musa spp.*

Para los ensayos descritos seguidamente se utilizó un modelo de diseño completamente al azar con 3 repeticiones.

4.1. Incremento del volumen celular de la suspensión celular después de la crioconservación.

Modelo del análisis de varianza fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_{ij} = volumen celular

μ = media general

τ_i = efecto del i- enésimo tratamiento

ε_{ij} = error experimental

4.1.1 Resultados de los análisis de varianza para la variable volumen celular en los ensayos crioconservación de *Musa spp.*

Variable	Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Valor de F	Prob> de F	Significa
Inc. V. C. (1)	ml (SCV)	2	0,2411	27,13	0,0010	**
Inc. V. C. (2)	ml (SCV)	4	0,3107	15,03	0,0003	**
Inc. V. C. (3)	ml (SCV)	4	0,1693	7,70	0,0042	**
Inc. V. C. (4)	ml (SCV)	4	0,4407	16,53	0,0002	**
Inc. V. C (5 a)	ml (SCV)	4	0,2700	13,97	0,0004	**
Inc. V. C (5 b)	ml (SCV)	4	0,0906	13,60	0,009	**

Inc. V. C = Incremento del volumen celular

1 = Ensayo 1

2 = Ensayo 2

3 = Ensayo 3

4 = Ensayo 4

5 = Ensayo 5

5 a= Testigos

5 b= Crioconservado

**= Significancia al 0,01 de Probabilidad

4.1.2. Prueba de Duncan de la variable volumen celular realizada a 0.05 de probabilidad.

Ensayo	Tratamiento	Promedio	Desviación Estándar	Grupo Duncan
Ensayo 1	Testigo	0,43	0,05	A
	Con Inducción	0,53	0,15	A
	Sin inducción	0	0	B
Ensayo 2	Testigo	0,43	0	B
	45 g/l de Sacarosa	0,36	0,208	B
	90 g/l de Sacarosa	0,90	0,2	A
	135 g/l de Sacarosa	1,13	0,05	A
	180 g/l de Sacarosa	0,63	0,05	B
Ensayo 3	Testigo	0,43	0,15	A
	Distrib. Central	0,46	0,05	A
	Distrib. Dispersa	0,26	0,20	B
	Medio Líquido	0	0	B
	M. l.+ 3 % DMSO	0	0	B
Ensayo 4	Testigo	0,80	0,1	A
	45 g/l Sacarosa	0	0	B
	135 g/l Sacarosa	7,66	0,35	A
	10 g/l Lac. (1 día)	0	0	B
	10 g/l Lac. (7 días)	0	0	B
Ensayo 5	Dom '1' Testigo	0,30	0,05	C
	Dom '1' Crio.	0	0	B
	GM '3' Testigo	0,56	0,20	B
	GM '3' Crio.	0	0	B
	SF '265' Testigo	1,06	0,15	A
	SF '265' Crio.	0,3	0,17	A
	Curraré '3' Testigo	0,33	0,11	BC
	Curraré '3' Crio.	0	0	B
	Col '49 2,8' Testigo	0,53	0,11	BC
	Col '49 2,8' Crio.	0,37	0,05	A

Distrib.=Distribución

Lac.= Lactosa

Dom = Dominico

GM = Gros Michel

Crio = Crioconservada

4.2. Formación de embriones a partir de suspensiones celulares después de la crioconservación.

Modelo del análisis de varianza fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_{ij} = número de embriones

μ = media general

τ_i = efecto del i -ésimo tratamiento

ε_{ij} = error experimental

4.2.1. Análisis de varianza para la variable número de embriones formados a partir de suspensiones celulares en cuatro ensayos de crioconservación de *Musa spp.*

Variable	Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Valor de F	Prob> de F	Significan
No. emb. (2)	No. emb.	3	10462037.55	2.04	0.1464	No
No. emb. (3)	No. emb.	3	142266.069	1.76	0.29	No
No. emb. (4)	No. emb.	3	5055558.39	1.90	0.17	No
No. emb. (5)	No. emb.	4	105086208.11	11.64	0.0001	**

Nota: Se hizo una prueba de 't' student para el ensayo 1 debido a que solamente fueron dos tratamientos analizados.

**= altamente significativo

No. emb = Numero de embriones

2 = Ensayo 2

3 = Ensayo 3

4 = Ensayo 4

5 = Ensayo 5

4.2.2. Prueba de Duncan de la variable número de embriones realizada a 0.05 de probabilidad.

Ensayo	Tratamiento	Promedio	Desviación Estándar	Grupo Duncan
Ensayo 1	Testigo	112168,61	20338,47	NE
	Con Inducción	13376,87	2527,55	
	Sin inducción	50	86,60	
Ensayo 2	Testigo	142383,40	69090,6	NE
	45 g/l de Sacarosa	8470,46	5731,53	A
	90 g/l de Sacarosa	16821	8925,82	A
	135 g/l de Sacarosa	17948	8172,96	A
	180 g/l de Sacarosa	16281,1	5215,64	A
Ensayo 3	Testigo	2177,51	1156,58	NE
	Distrib. Central	493	171,02	A
	Distrib. Dispersa	27,33	46,47	B
	Medio Líquido	0	0	B
	M, L, + 3 % DMSO	0	0	B
Ensayo 4	Testigo	19317,28	1360,81	NE
	45 g/l Sacarosa	45	69,46	B
	135 g/l Sacarosa	1868,83	2155,97	A
	10 g/l Lac. (1 día)	11,00	17,61	B
	10 g/l Lac. (7 días)	43,63	49,86	B
Ensayo 5	Dom. '1' Testigo	201184,65	60138,49	NE
	Dom. '1' Crio.	655,73	413,84	B
	GM '3' Testigo	183929,85	53680	NE
	GM '3' Crio.	0	0	B
	SF '265' Testigo	244033,02	59341,37	NE
	SF '265' Crio.	8257,37	1553,62	A
	Curraré '3' Testigo	68616,81	28306,12	NE
	Curraré '3' Crio.	7987,16	2380,48	A
	Col '49 2,8' Testigo	26581,86	11205,76	NE
Col '49 2,8' Crio.	6977,76	4524,2	A	

NE= tratamientos que no fueron incluidos en el análisis de varianza debido a que fueron realizadas con diferente concentración de células.

Distrib.=Distribución
 Lac.=Lactosa
 Dom.= Dominico
 GM=Gros Michel
 Crio. = crioconservado

4.3. Porcentaje de germinación de embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares después de la crioconservación.

Modelo del análisis de varianza fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_{ij} = Porcentaje germinación

μ = media general

τ_i = efecto del i- enésimo tratamiento

ε_{ij} = error experimental

4.3.1. Análisis de varianza de la variable germinación en los ensayos crioconservación de *Musa spp.*, CATIE, 1998.

Variable	Fuente De Variación	Grados De Libertad	Cuadrado Medio	Valor De F	Prob> De F	Significa
Germinación (1)	Porcentaje (%)	2	1321.71	11.41	0.0045	*
Germinación (2)	Porcentaje (%)	4	1011.405	20.16	0.0001	**
Germinación (5)	Porcentaje (%)	9	2561.85	32.72	0.0001	**

Nota: no se realizó análisis de varianza de los experimentos 3 y 4 debido a la falta de embriones.

2 = Ensayo 2

3 = Ensayo 3

5 = Ensayo 5

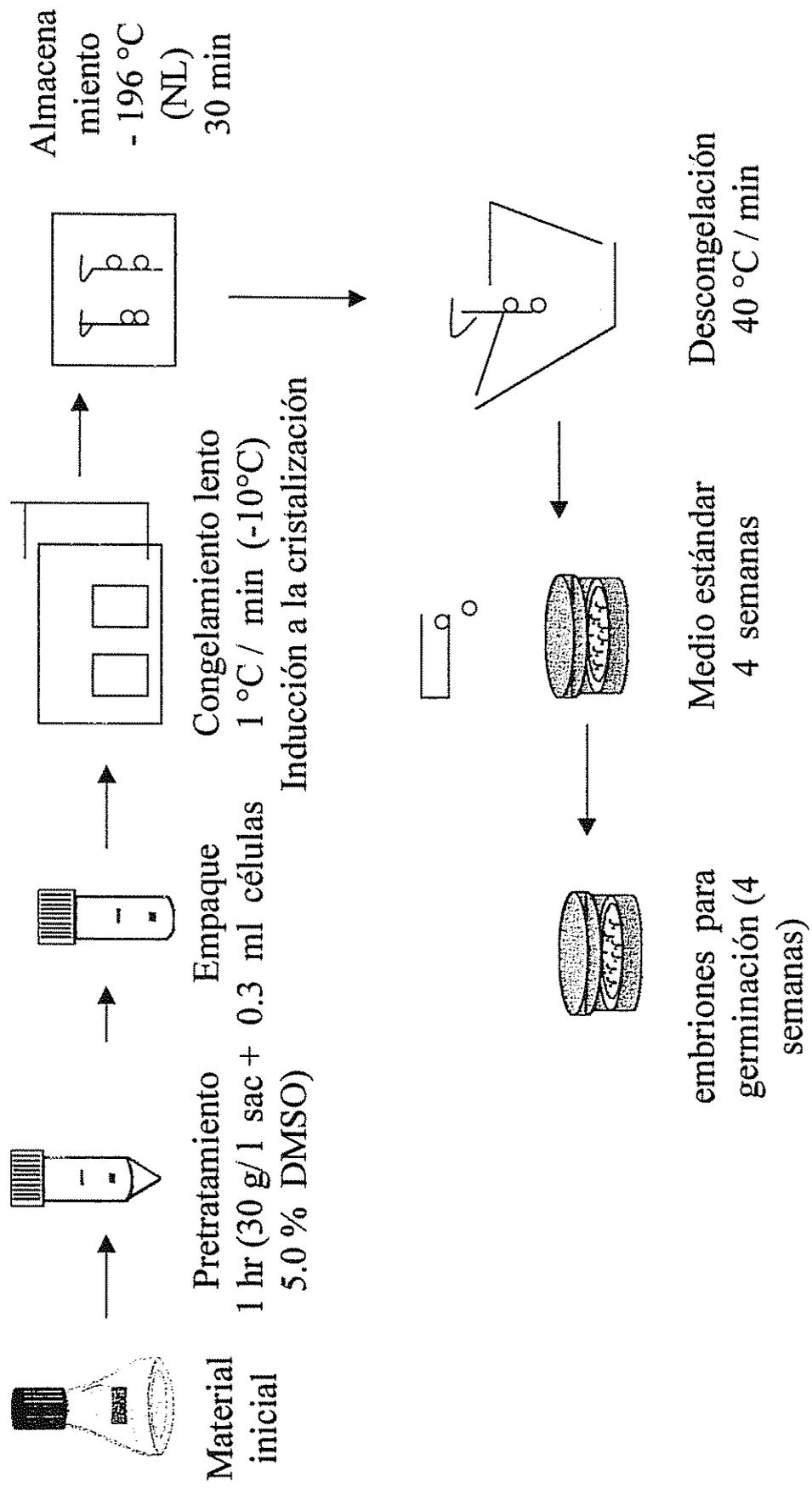
**=altamente significativa

*= significativa

4.3.2. Prueba de Duncan de la variable porcentaje de germinación realizada a 0.05 de probabilidad.

Ensayo	Tratamiento	Promedio	Desviación Estándar	Grupo Duncan
Ensayo 1	Testigo	59.83	7.31	A
	Con Inducción	54.31	11.13	A
	Sin inducción	22.67	14.04	B
Ensayo 2	Testigo	93.6	6.06	A
	45 g/l de Sacarosa	56.8	8.67	C
	90 g/l de Sacarosa	82.4	3.57	A
	135 g/l de Sacarosa	85.87	5.1	A
	180 g/l de Sacarosa	70.53	9.7	B
Ensayo 5	Dom. '1' Testigo,	54.74	6.37	B
	Dom '1' Crio.	19	10.32	BC
	GM '3' Testigo	34	16.1	CD
	GM '3' Crio	0	0	F
	SF '265' Testi.go	90	7.65	A
	SF '265' Crio.	19	8.86	DC
	Curraré '3' Testigo	54	6.92	B
	Curraré '3' Crio.	36	8.64	C
	Col '49 2,8' Testigo	12	5.65	EF
	Col '49 2,8' Crio.	26	8.32	CDE

Anexo 5. Representación esquemática del protocolo base (Panis et al. 1990).



Anexo 6. Representación esquemática de las modificaciones del protocolo base, CATIE, 1998.

