CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA

PROGRAMA DE POSGRADO

Estudio del uso de la crioconservación de embriones cigóticos de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata*.

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

Magister Scientiae

por

María Alejandra Mora Avilés.

CATIE

Turialba, Costa Rica

1990

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

COMITE ASESOR:

Víctor M. Villalobos, Ph.D.
Profesor Consejero

Ana María Abdelnour, M.Sc.
Miembro del Comité

Jean Vincent Escalant, Ph.D.
Miembro del Comité

Richard Taylor, Ph.D.
Miembro del Comité

Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado

Dr. José Luis Parisí
Subdirector General Adjunto de Enseñanza

María Alejandra Mora Avilés
Candidato

A MINA, EL HADA DE MI CASA, LA DE LOS MIL REMEDIOS.

A MARIANO QUE CRECE Y CRECE POR ENCIMA DE SU ALTURA Y PARA QUIEN NO TENGO PALABRAS.

A CLAUDIA Y MARIANO QUE CAMINAN SIEMPRE CONMIGO.

AGRADECIMIENTOS

La autora desea expresar sus más sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

A la M. Sc. Ana Abdelnour, por sus enseñanzas, estímulo, gran dedicación y su valiosa amistad.

A mi profesor consejero, Dr. Victor M. Villalobos, influencia innegable de mi crecer profesional, por haber compartido conmigo tanta experiencia y saber.

A los miembros de mi comité asesor: Dr. Vincent Escalant, Dr. Richard Taylor y Dr. Ramón Lastra, por tan sincero y dedicado apoyo, y valiosas sugerencias en la elaboración de este trabajo.

Al Centro Agronómico Tropical De Investigación y Enseñanza y su comunidad, que lo hacen aun más querido.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Y Agropecuarias (I.N.I.F.A.P.), por brindarme la oportunidad y el apoyo para el logro y realización de esta empresa.

A mis compañeros todos de la promoción 88-90 que enriquecieron mi vida con las suyas.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, María Elena Aguilar, Silvana Alvarenga, Nelly Vázquez, Lissette Vega, Gabriel Robles, Vicente Febres y Emilio Mora por ser tan ellos, que por siempre así sean.

A todo el personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos por abrirme sus brazos y soportar mis excesos; por su entusiasmo. optimismo y gran lucha

A las M. Sc. Martha Marín, Lourdes Van Heurck, Marielos Alfaro, Beatriz Sandoval y Jenny Suazo mis 5 duendes, por su enorme cariño. Las mejores amigas que alguien ha tenido jamás.

Gracias.

BIOGRAFIA

La autora, de nacionalidad mexicana, nació en la ciudad de Celaya, Estado de Guanajuato, el 12 de agosto de 1966. Realizó sus estudios de Educación Media Superior en la Escuela Preparatoria Lic. Eduardo Ruíz de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y los Estudios de Educación Superior en la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, de la cual egresó en 1987 graduándose de la licenciatura en Biología.

En 1988 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE en Costa Rica, en el Programa Mejoramiento de Cultivos Tropicales, egresando en noviembre de 1990.

Actualmente es miembro investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias en México, desde 1988.

CONTENIDO

Página

Dedicatoria iii
Agradecimientos iv
Biografía vi
Resumen xi
Summary xiii
Lista de Figuras xv
Lista de Cuadros xvii

I. INTRODUCCION. 1

2. REVISION DE LITERATURA. 4

2.1 Importancia De La Conservación De Los Recursos Genéticos. 4

2.2 Problemas En La Conservación De Los Recursos Genéticos. 7

2.3 Necesidad De La Conservación De Los Recursos Genéticos. 9

2.4 Sistemas De Almacenamiento Del Germoplasma. 10

2.4.1. Sistemas Convencionales. 10

2.4.2. Sistemas *in vitro*. 12

2.4.2.1. Métodos De Conservación De Germoplasma *in vitro*. 15

2.4.2.1.1. Conservación A Corto y Mediano Plazo. 15

2.4.2.1.2. Conservación A Largo Plazo o CRIOCONSERVACION. 19

2.5 El Género *Musa*-Un Recurso Genético Importante. .26

2.5.1. Generalidades. 26

2.5.2. Clasificación Taxonómica. 28

2.5.3. Historia Del Cultivo *in vitro* De *Musa*. ..31

2.6. Estabilidad Genética *in vitro*. 34

2.6.1. El Bagaje Genético De Los Diploides. 35

2.7. Conservación De Germoplasma De *Musa spp*. 36

3. MATERIALES Y METODOS. 38

3.1. Facilidades Del Laboratorio. 38

3.2. Material Vegetal Estudiado. 38

3.2.1 Especies, Cultivares y Genoma. 38

3.3. Desinfección y Aislamiento De Los Embriones Cigóticos. 41

3.4. Medio De Cultivo. 42

3.5. Ensayos Preliminares Con Crioprotectores. 44

3.6. Crioconservación De Embriones Cigóticos. 46

3.6.1. Condiciones De Pretratamiento. 46

3.6.2. Congelamiento-Descongelamiento. 47

3.6.3. Recuperación. 48

3.6.4. Tratamientos. 48

3.6.4.1. Descripción De Los Tratamientos. ..48

3.7. Análisis De Sobrevivencia. 49

3.8. Análisis Histológico. 50

4. RESULTADOS. 55

4.1. Determinación Del Estado De Madurez Del Embrión Para Crioconservación. 55

4.2. Ensayos Preliminares Con El Uso De Crioprotectores. 56

4.3. Ensayos Preliminares De Congelamiento De Embriones Con Crioprotectores y Sin Ellos. 60

4.4. Sobrevivencia De Los Embriones Dentro De Cada Tratamiento. 60

4.5. Germinación De Los Embriones. 67

4.6. Estudio Histológico De Los Embriones Crioconservados. 70

4.6.1. Gran Control. 70

4.6.2. Control Embriones Deshidratados Sin Congelamiento. 71

4.6.3. Embriones No Sobrevivientes. 71

4.6.4. Embriones Sobrevivientes Sin Germinación.72

4.6.5. Embriones Sobrevivientes y Germinando. ..72

5. DISCUSION. 81

5.1. Determinación Del Estado De Madurez Del Embrión Cigótico Para Su Crioconservación. 81

5.2. Efecto De La Deshidratación En Precultivo Sobre La Resistencia De Los Embriones Cigóticos De *Musa*. .84

5.3. Ensayos Preliminares De Congelamiento De Embriones Cigóticos Con Crioprotectores. 84

5.4. Efecto De Los Tratamientos En La Recuperación Del Embrión Cigótico De *Musa balbisiana* Posterior Al Descongelamiento. 85

5.5. Efecto De Los Tratamientos En La Recuperación Del Embrión Cigótico De *Musa acuminata* Posteriro Al Descongelamiento. 91

5.6. Efecto De Los Tratamientos Sobre La Germinación De Los Embriones Cigóticos De *Musa balbisiana*. 93

6. CONCLUSIONES. 94

7. RECOMENDACIONES. 96

8. BIBLIOGRAFIA. 98

MORA A, M.A, 1990. Estudio del uso de la crioconservación de embriones cigóticos de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 109 P.

Palabras claves: *Musa acuminata ssp. burmaniccoides* (Calcutta 4), *Musa balbisiana*, embriones cigóticos, crioconservación, crioprotección, deshidratación, congelamiento directo, tasa de sobrevivencia, tasa de recuperación, tasa de germinación, almacenamiento de germoplasma

RESUMEN

Embriones cigóticos de *Musa acuminata ssp. burmaniccoides* (Calcutta 4) y *Musa balbisiana*, fueron examinados por su habilidad a resistir el congelamiento a ultrabaja temperatura (-196°C). Los embriones fueron sometidos a diferentes tiempos de deshidratación como pretratamiento y congelados directamente en nitrógeno líquido sin ninguna sustancia crioprotectora.

Los ensayos preliminares con crioprotectores utilizando elevadas concentraciones de sacarosa (0.75 M), no afectaron la viabilidad de *Musa balbisiana*, en cambio, *Musa acuminata* redujo ésta hasta el 50 %. Cuando se utilizó DMSO a 0, 5 y 10 % se obtuvo para *Musa balbisiana* en un período de incubación de 24 horas una viabilidad del 100 %, no así para 48 horas con una disminución del 50 %. *Musa acuminata* por su parte, fué aún más sensible para ambos períodos de incubación.

La deshidratación de los embriones cigóticos de *Musa* con aire estéril en la cámara de flujo laminar, como una alternativa viable, demostró ser una fuerte herramienta para la conservación de este importante germoplasma. Los embriones, para ambas especies, obtuvieron un 100 % de recuperación a las 2 horas de deshidratación (8 % de humedad), sin congelamiento.

Durante la recuperación, posterior al congelamiento, *Musa balbisiana* obtuvo hasta un 70 % de sobrevivencia máxima a las 2 horas de deshidratación y una mínima a 0.5 horas. Por su parte, *Musa acuminata* logró durante el mismo período de 2 horas, un 73.88 % de sobrevivencia. Nuevamente, el porcentaje mínimo de sobrevivencia se obtuvo a 0.5 horas de deshidratación con un 35 % de sobrevivencia (26 % humedad).

El empleo de sacarosa aunado a la deshidratación no representó diferencia alguna comparado cuando no fué utilizada.

En la germinación de los embriones de *Musa balbisiana*, se presentó una tendencia a mostrar una germinación superior con 1 mg/l de ABA y ligeramente menor cuando fué utilizado 0.5 mg/l de BA. La germinación de la especie *Musa acuminata* no fué evaluada debido a la gran heterogeneidad de las repuestas.

MORA A, M.A. 1990. Study of the use of cryopreservation on *Musa acuminata* and *Musa balbiisana*. Master of Science Thesis. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 109 P.

Key words: *Musa acuminata ssp. burmaniccoides* (Calcutta 4), *Musa balbisiana*, zygotic embryos, cryoconservation, cryoprotection, dessication, direct freezing, survival rate, recovery rate, , germination rate, germplasm storage.

SUMMARY

Zigotic embryos of *Musa acuminata* (AA) *ssp. burmaniccoides* (Calcutta 4) and *Musa balbisiana* (BB), were tested for their ability to survive freezing at ultralow temperature (-196°C). As a pretreatment embryos were dessicated in a steril air flow and frozen by direct immersion in liquid nitrogen without cryoprotectants.

Preliminary assays using high concentrations of sucrose (up to 0.75 M) as cryoprotectant did not afect the viability of *Musa balbisiana*, but the viability *Musa acuminata* embryos decrease to 50 %. DMSO was also tested as cryoprotectant at concentrations of 0, 5 and 10 %. Embryos of *Musa balbisiana* incubated for 24 hours were not afected; however, when incubated for 48 hours a 50 % viability was observed. *Musa acuminata* was even more sensitive to DMSO at the incubation periods tested.

Desiccation of *Musa* zygotic embryos in the laminar flow cabinet resulted a valuable tool for cryopreservation of this important germplasm. For both species, a 100 % recovery was observed after 2 hours desiccation period (8 % humidity) for the control without freezing. After freezing, *Musa balbisiana* and *Musa acuminata* showed a 70 % and 73.88 % survival respectively when dessication for 2 hours; and 35 % when dessication for 0.5 hours period. Embryos without dessication treatment did not survieve.

The use of sucrose in addition to dessication did not differ to the use of dessication above.

The effect of ABA an BA on embryo germination was examined. The germination of *Musa balbisiana* on the media with 1 mg/l ABA was higher than the germination on 0.5 mg/l BA. The germination of *Musa acuminata* is not reported due to variety in the responses.

LISTA DE FIGURAS

En el texto: Página

Figura 1. Corte esquemático de una semilla y de un embrión de *Musa* 40

Figura 2. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la tasa de viabilidad de los embriones de *Musa balbisiana* 58

Figura 3. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la tasa de viabilidad de los embriones de *Musa acuminata* 58

Figura 4. Promedio de sobrevivencia por tratamiento de *Musa balbisiana* 62

Figura 5. Promedio de sobrevivencia por tiempo de deshidratación de *Musa balbisiana* 62

Figura 6. Promedio de sobrevivencia por tratamiento de *Musa acuminata* 64

Figura 7. Promedio de sobrevivencia por tiempos de deshidratación de *Musa acuminata* 64

Figura 8. Promedio de germinación por tratamiento de *Musa balbisiana* 69

Figura 9. Promedio de germinación por tiempo de deshidratación de *Musa balbisiana* 69

Figura 10. Microfotografía de un corte histológico de un embrión cigótico de *Musa* con células del primordio radical y meristema apical en desarrollo (4X) 74

Figura 11. Células en división a nivel de haustorio (20X) 74

Figura 12. Detalle de estructuras proembriónicas a nivel de haustorio (40X) 75

Figura 13. Células en activa división en el haustorio y epidermis (20X) 75

Figura 14. Corte longitudinal de un embrión sometido a deshidratación (4X) 76

Figura 15. Células en división a nivel de haustorio de un embrión sometido a deshidratación (20X) 76

Figura 16. Estructura proembriónica en haustorio de un embrión deshidratado (100X) 77

Figura 17. Histología de un embrión cigótico sometido a congelamiento (4X) 77

Figura 18. Células de un embrión no sobreviviente (20X) ..78

Figura 19. Embrión sometido a congelamiento con divisiones periclinales y células colapsadas (20X) 78

Figura 20. Embrión germinando con gran producción de fenoles (4X) 79

Figura 21. Gémula de un embrión recuperado (20X) 79

Figura 22. Embrión recuperado del congelamiento, germinando y con gran desarrollo radical (4X) 80

Figura 23. Células del haustorio en división (10X) 80

LISTA DE CUADROS

En el texto: **Página.**

Cuadro 1. Respuesta de sobrevivencia de embriones cigóticos de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata* al pretratamiento con crioprotectores 59

Cuadro 2. Resultados de la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad de los tiempos de deshidratación con respecto a la sobrevivencia de los embriones cigóticos de *Musa balbisiana*. 63

Cuadro 3. Análisis de varianza para los embriones cigóticos de *Musa acuminata* en los diferentes tratamientos y tiempos de deshidratación. 63

Cuadro 4. Prueba de Duncan al 5 % de probabilidad de los diferentes tratamienos con respecto a la sobrevivencia de los embriones cigóticos de *Musa acuminata*. 66

Cuadro 5. Prueba de Duncan al 5 % de probabilidad de los diferentes tiempos de deshidratación con respecto a la sobrevivencia de embriones de *Musa acuminata*. 66

Cuadro 6. Prueba de Duncan al 5 % de probabilidad de los diferentes tratamientos con respecto a la germinación de los embriones cigóticos de *Musa balbisiana* 68

I. INTRODUCCION.

A mediados de los 60's se hizo notar que muchas especies silvestres estaban amenazadas con extinguirse y que los genes existentes de cultivos importantes estaban disminuyendo. Fué solamente con el establecimiento del "International Board for Plant Genetic Resources" (IBPGR), en 1974, que comenzó un programa internacional real para la conservación de germoplasma de cultivos tropicales y subtropicales. Bananos y plátanos han sido identificados entre los cultivos prioritarios para su conservación (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

La vía más conveniente para mantener germoplasma vegetal es mediante el almacenamiento de semillas, pero ésta no es posible para plantas propagadas vegetativamente, tales como el banano y el plátano. Para tales casos, las colecciones de campo han sido establecidas, sin embargo, éstas demandan erogaciones importantes en mano de obra y espacio, y están sujetas a altos riesgos de pérdida debido a enfermedades, plagas y alteraciones del medio ambiente, entre otras (Simmonds, 1979).

Una alternativa a las colecciones de campo es el establecimiento *in vitro* de colecciones bajo condiciones de crecimiento normales o limitadas (Withers, 1984; Banerjee y De Langhe, 1985). Para el almacenamiento a largo plazo, sin embargo, la eliminación de subcultivos de rutina es deseable porque: 1) en tanto que la división celular ocurra, las mutaciones pueden surgir; 2) en cada subcultivo hay riesgo de pérdida debido a contaminación o por error humano; 3) aún si los subcultivos pueden ser reducidos a una vez por año, sería requerida mucha labor para mantener una colección grande.

Por consiguiente, la crioconservación es una solución ideal para la conservación de colecciones de germoplasma a largo plazo. Bajo condiciones de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196° C), hay una detención completa de todas las reacciones químicas en la célula. Consecuentemente, no tiene lugar la división celular, la degeneración celular o los cambios genéticos a lo largo del tiempo (Hauptmann y Widholm, 1982; Banerjee y De Langhe, 1985).

Hasta ahora, la crioconservación de tejido de *Musa* no ha sido publicada. Hace algunos años, experimentos de congelamiento con meristemas de *Musa* fueron llevados a cabo por Panis y Bamerjee (no publicado). Varios regímenes de congelamiento fueron intentados, pero no fué obtenida sobrevivencia cuando las muestras fueron sometidas a temperaturas debajo del punto de congelamiento de la solución crioprotectora utilizada.

Recientemente, ha sido establecido el cultivo en suspención de células embriogénicas de *Musa* (Sannasgala, en preparación). Panis *et al.* (1990), crioconservaron células en suspención y obtuvieron la subsecuente regeneración de la planta. Sin embargo, es bien sabido que la regeneración de plantas a partir de células en suspención y callo presenta, dependiendo de las condiciones de cultivo, una gran inestabilidad y el riesgo de variación somaclonal se incrementa, lo que representa un gran riesgo cuando de conservación se trata.

Hasta este momento, el material clásico utilizado en crioconservación, han sido ápices, meristemos, embriones somáticos y células en suspención. Por otra parte, poca atención se le ha brindado a los embriones cigóticos aún cuando la diversidad genética existe sin duda en las especies progenitoras, además de que poseen todas las características apropiadas para lograr el éxito en su crioconservación.

En este trabajo se presenta el estudio de un protocolo alternativo de crioconservación de embriones cigóticos de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata*, los cuales fueron sometidos a diferentes tiempos de deshidratación como pretratamiento y el subsecuente congelamiento directo en nitrógeno líquido. Los resultados obtenidos muestran una posibilidad muy optimista para la conservación de este material de gran diversidad genética.

2. R E V I S I O N D E L I T E R A T U R A.

2.1 Importancia De La Conservación De Los Recursos Genéticos.

Germoplasma Vegetal-Un Recurso Natural Amenazado.

Los recursos fitogenéticos son recursos naturales limitados y perecederos, que proporcionan la materia prima o genes que debidamente utilizados y combinados por los técnicos en genética vegetal originan mejores variedades de plantas.

Los genes se encuentran dispersos en especies locales y poblaciones naturales de plantas, que han sido seleccionados a lo largo de miles de años por la naturaleza y los agricultores, por sus características de adaptación, resistencia y/o productividad. Sin la disponibilidad de estos recursos para los centros de investigación agrícola, la mejora de variedades no se hubiera logrado.

En los últimos años, el desarrollo de "nuevas" tecnologías, la substitución de variedades locales por variedades mejoradas, la colonización de nuevas tierras, los cambios en las técnicas de cultivos, etc., están provocando una rápida y profunda erosión en los mencionados recursos, que puede llevar a la extinción de un material de valor incalculable y que apenas ha sido explorado. La erosión genética afecta tanto a las especies cultivadas como a muchas especies silvestres de uso agrícola, directo, indirecto o potencial.

Un incremento contínuo en la producción y calidad de los alimentos, pasa por la protección y eficaz utilización de los recursos fitogenéticos y ello exige su recolección, conservación, evaluación, documentación e intercambio (Esquinas, 1981).

La conservación genética en particular puede ser, técnica, científica y logísticamente exigente; es en todo sentido una conducta crítica. Esta área coincide con la reproducción vegetal, en que la conservación no es solo preservación por bien propio, sino que es una aporte importante para el mejoramiento de los cultivos (Peeters y Williams, 1984). Para muchos cultivos, incluyendo muchas de las fuentes principales de alimento para el mundo, la conservación genética puede ser llevada a cabo muy eficiéntemente en bancos de semilla (Ellis *et al.*, 1985a; 1985b; Williams, 1984). Sin embargo, hay importantes y notables excepciones (De Langhe, 1984; Withers, 1980a; 1984a; Withers y Williams, 1985). Primeramente, hay cultivos que producen semillas recalcitrantes, identificadas como aquellas que no se adaptan al patrón clásico de almacenamiento de semillas, que involucran la desecación y el almacenamiento en frío (Roberts *et al.*, 1982; 1984). Algunos ejemplos incluyen el mango, hule, cacao, coco y roble. Segundo, algunos cultivos clonales son estériles o bien no desarrollan una reproducción sexual real, debido a la gran heterogeneidad, entre otras cosas. Muchas raíces y tubérculos de importancia como fuente de alimento (Ej. ñame, papa, yuca y camote) y frutos como banano y plátano entran en esta categoría. En ejemplos donde los clones podrían ser teóricamente reconstituidos a partir de semillas (en las plantas no se puede crear o mantener un amplio grado de variabilidad genética si no es a través de su reproducción sexual), tales como algunas raíces y tubérculos, manzana, pera y frutos de clima templado, el éxito no sería

garantizado y sería un desperdicio considerable de esfuerzo en la reproducción.

Actualmente, "cultivos problema" son conservados tanto en bancos genéticos o colecciones de campo, como en propágulos vegetativos o en reservas naturales ("conservación *in situ*"). Argumentos de costos, seguridad, acceso, practicidad y suficiencia, pueden ser puntos en contra en la aproximación a la conservación. El almacenamiento *in vitro* ha sido propuesto como un medio para superar este tipo de problemas (De Langhe, 1984; IBPGR, 1983; Withers, 1980a; Withers y Williams, 1985). Esta aplicación de la tecnología de almacenamiento ha sido, de hecho, un fuerte motivador para planeamiento, investigación y desarrollo de fuentes alternas de conservación.

En principio, todos los sistemas de cultivo desde la suspención de células hasta la planta *in vitro* son apropiadas para la conservación. En ambos, el punto inicial y el punto final son plantas completas y es lógico pretender el mantenimiento de un nivel de organización elevado durante el almacenamiento. El objetivo de la conservación de germoplasma vegetal es mantener la diversidad genética en una condición estable y ninguna de las técnicas de almacenamiento deberá poner en riesgo la estabilidad, ni deberá existir peligro de disminuir la diversidad genética por selección; por lo que siempre será más apropiado usar sistemas de cultivo que minimicen los riesgos de variación somaclonal, tales como ápices y embriones (Scowcroft, 1984; 1985).

Por otra parte, si el objetivo agrícola es satisfacer las necesidades de la creciente población mundial y evitar un número aterrador de individuos desnutridos en países en desarrollo, el mejoramiento debe ser dirigido hacia el incremento de las cosechas. Sin embargo, para evitar conflictos entre la conservación y las demandas de la productividad agrícola, las estrategias y métodos adoptados deben tomar en cuenta las realidades de la utilización del germoplasma. El material destinado a almacenamiento no debe ser solamente aquel que es fácil de colectar y almacenar sino que debe ser representativo del bagaje génico del cultivo, y debe ser evaluado minuciosamente para facilitar la selección del material a mejorar (Withers, 1987).

2.2 Problemas En La Conservación De Los Recursos Genéticos.

Cuando se habla de conservación de germoplasma, el objetivo es conservar con la mayor integridad posible, la variabilidad genética de la especie seleccionada. Así, los métodos que tiendan a conservar en forma adecuada esta integridad, serán los más eficientes para lograr el fin mencionado (Rubluo, 1985).

La estrategia de conservación del germoplasma depende de la naturaleza del material biológico y está definida por la duración de su ciclo de vida, el tipo de reproducción, el tamaño de los individuos y el nivel ecológico (silvestre o domesticado). De acuerdo con estas características se han intentado diversos métodos de conservación, los cuales van desde el tradicional banco de semillas hasta el mantenimiento de áreas de reserva (Rubluo, 1985).

La conservación de germoplasma en especies tropicales es considerada difícil debido al hecho que muchas especies son recalcitrantes (Withers, 1985), por lo que se tienen que propagar asexualmente. Ejemplos de tales especies son café, cacao y *Musas*. Estas especies son consideradas cultivos prioritarios y de gran importancia económica para los países de la región Centroamericana. Para almacenar el germoplasma de estas plantas, es necesario establecer plantaciones en el campo (jardines), lo cual no solamente es un método de costo elevado, debido a que en muchos casos, su promedio de vida es corto y es necesario propagarlas al menos anualmente, sino que, además, presenta el riesgo de perder el material que se requiere preservar por causa de plagas y enfermedades o condiciones climáticas adversas (Devlin, 1976; Hawkes, 1970).

En este caso se han intentado establecer metodologías adecuadas para su conservación. Sin embargo, en la práctica estos procedimientos a veces no resultan factibles o, al menos, son difíciles de efectuar (Rubluo, 1985).

Siguiendo la demanda del mercado, los mejoradores de plantas, las casas comerciales de semillas y el Estado mismo, han aunado sus esfuerzos para proporcionar nuevas variedades uniformes y generalmente más productivas con las cuales poder sustituir una enorme diversidad de variedades locales heterogeneas y primitivas más adaptadas a las necesidades de otra época (Esquinas, 1981).

No se debe olvidar, sin embargo, que el punto de partida del fitomejorador es la diversidad genética representada por los materiales heterogeneos y criollos de los agricultores tradicionales.

2.3 Necesidad De La Conservación De Los Recursos Genéticos.

La evolución de las técnicas de selección y de las prácticas culturales está llevándose a cabo despues de numerosos años de desaparición de especies vegetales silvestres y cultivares tradicionales. La extinsión de ciertas especies del centro de origen y la uniformización de variedades cultivadas en particular, contribuyen a la disminución de la variabilidad genética natural (Kartha, 1981; Sprague, 1980). Además, debido a la creciente demanda de recursos nutritivos, la selección hecha por el hombre ha conducido al surgimiento de cultivares muy productivos pero que poseen una base genética muy estrecha. Así, si bien es posible incrementar la productividad de las especies cultivadas, es igualmente considerable la reducción de las facultades de adaptación en caso de un eventual "accidente" climático o patológico (Fabre, 1986).

La justificación para la conservación de los recursos fitogenéticos es la utilización eventual, en programas de selección, de genotipos nuevos surgidos de mutaciones y que por tanto hace necesaria su conservación. Estos diferentes aspectos del problema, hacen surgir la necesidad de constituir de las colecciones varietales, reagrupamientos no solamente de las variedades cultivadas, sino también de las especies silvestres, para que así puedan intervenir en los programas de mejoramiento de estas variedades cultivadas (Charrier, 1982).

2.4 Sistemas De Almacenamiento Del Germoplasma.

2.4.1. Sistemas Convencionales.

Idealmente, mucho germoplasma vegetal debería ser conservado *in situ*, en su medio ambiente natural, co-existiendo con los otros elementos vivientes de ese medio ambiente. Sin embargo, un número de experiencias tanto prácticas como científicas requiere que el germoplasma sea conservado por vías adicionales (*ex situ*). Actualmente, Las reservas *ex situ* se mantienen como banco de semillas y colecciones de campo.

Los bancos de semillas están divididos en colecciones base y activas. Las colecciones base consisten en el almacenamiento de semillas ortodoxas a temperaturas de -17° C a -20° C y se pretende que el material pase décadas o centurias en almacenamiento. Las colecciones activas a mediano y corto plazo envuelven un almacenamiento por debajo o por arriba de los 5° C, por períodos que oscilan desde unos pocos meses hasta 20 años. Toda la semilla es almacenada en un estado parcialmente desecado y no es verdaderamente congelada a ninguna de las temperaturas usadas. Alrededor de 30 institutos importantes en el mundo utilizan ahora el almacenamiento en refrigeración para las semillas (Plucknett *et al.*,1983).

Los almacenes de semillas requieren de un mantenimiento relativamete simple pero constante, proporcionando estabilidad de temperatura y humedad. Las pruebas periódicas de viabilidad y la restitución del germoplasma existente, tienen que ser llevados a cabo también. Desafortunadamente, las semillas de cierto número de cultivos tropicales y templados, especialmente frutales, especies maderables y acuáticas (King y Roberts, 1979;

Roberts y King, 1982), no pueden ser almacenadas por medios convencionales ya que pierden su viabilidad cuando son desecadas debajo de cierto contenido de humedad y/o cuando son expuestas a bajas temperaturas. Roberts (1973), acuñó el nombre de "ortodoxas" para las semillas que toleran una disminución significativa de su contenido de humedad y el nombre de "recalcitrantes" para aquellas que no toleran este tratamiento, pues la reducción de su humedad interna provoca procesos químicos irreversibles que originan la muerte del embrión (Esquinas, 1981).

En las mejores condiciones, las semillas recalcitrantes pueden ser almacenadas por unos pocos meses en estado de humedad y protegidas por algún agente osmótico (King y Roberts, 1979; Roberts y King, 1982). Para las semillas recalcitrantes y cultivos vegetativos los cuales son estériles o producen semillas con gran segregación, la opción está dirigida a la conservación en plantaciones a mediano y largo plazo, y el almacenamiento de propágulos vegetativos (método poco satisfactorio) a corto plazo.

Mención aparte merece la conservación de cultivos de reproducción vegetativa, como es el caso de los frutales, fresa, papa, etc. Una característica de estas especies cultivadas, es que la naturaleza y el agricultor han seleccionado durante siglos no solo genes, sino también las combinaciones alélicas más "convenientes" en genotipos muy heterocigóticos, que se mantienen gracias al sistema de reproducción vegetativa utilizada para su propagación. Son estos fenotipos y no solo los genes que los integran, los que interesan y no es por tanto suficiente guardar las semillas, que al proceder de parentales heterocigóticos producirían una alta segregación con la aparición de nuevos genotipos y la pérdida del genotipo inicial (Esquinas, 1981).

Además, las plantaciones tienen desventajas en que éstas son geográficamente restringidas, caras de mantener y están expuestas a eventos ecológicos, patológicos y organizacionales los cuales pueden ocacionar pérdidas de la mayor parte del bagaje génico (Wilkes, 1983).

El polen como material a ser almacenado, ha recibido relativamente poca atención, pues se tiene nuevamente la presencia de especies "ortodoxas" y "recalcitrantes". Para especies ortodoxas, puede ser llevado a cabo el almacenamiento bajo condiciones de humedad controlada a temperatura ambiente o bajo cero (Roberts, 1975).

Finalmente, los cultivos *in vitro* están siempre sujetos a la conservación en que son mantenidos en un medio ambiente cuidadosamente controlado. Sin embargo, problemas prácticos en su almacenamiento combinan y reúnen algunos de aquellos del banco de semillas y plantaciones, más los riesgos adicionales de contaminación microbial e inestabilidad genética crítica (Withers, 1987).

2.4.2. Sistemas *in vitro*.

El descubrimiento de la totipotencia de la célula y la posibilidad de desarrollar plantas normales y completas a partir de células aisladas, ha permitido pensar en el establecimiento de bancos de germoplasma, utilizando el cultivo de tejidos vegetales (Rubluo, 1985). El término "cultivo de tejidos" recubre un cierto número de técnicas incluidas el cultivo *in vitro* de células, protoplastos, callos, órganos (meristemas, óvulos, anteras) y de embriones (cigóticos, polínicos, somáticos). Estas técnicas, iniciadas desde 1939 gracias a los trabajos de Gautheret y de White, los cuales han sido desarrollados a través de todos éstos años con el objeto de permitir el estudio de

diversos aspectos fundamentales prácticos, de la biología del desarrollo.

La posibilidad de producir plantas exentas de virus (por cultivo de meristemos), aunado a la capacidad de obtener una tasa de multiplicación elevada, independientemente de las condiciones climáticas, han hecho del cultivo de tejidos un método importante de conservación de los recursos fitogenéticos.

El uso de los métodos *in vitro* para la conservación de germoplasma comprende varios pasos (Roca, 1983):

1) Excisión del tejido u órgano de la planta madre;

2) Establecimiento del cultivo *in vitro*;

3) Conservación por medio de un método adecuado;

4) Recuperación del tejido viable de la fase de conservación;

5) Regeneración de plantas;

6) Análisis de la F1 y F2.

Un rango muy amplio de cultivo de células y tejidos han sido probados por su capacidad para la preservación *in vitro*. Para el propósito de conservación de germoplasma, es imperativo escoger un sistema de cultivo que minimice las oportunidades de un cambio genético. Desde que las mutaciones y rearreglos cromosomales han sido asociados a los cultivos de callo y plantas regeneradas a partir de

callos, muchos esfuerzos para preservar el germoplasma han utilizado ápices meristemáticos o cultivo de ápices. El cultivo de ápices meristemáticos es recomendado si la eliminación de virus es deseada. Si las plantas están infectadas con virus, los ápices usualmente no producirán plantas libres de enfermedades. Sin embargo, si la eliminación de virus no es necesaria, los ápices serían el explante a elegir por ser más fáciles de aislar que los meristemas y frecuentemente tienen menos requerimientos del medio de cultivo (Reed, 1989).

Ha habido interés en la preservación del cultivo de embriones somáticos y cigóticos; sin embargo, el trabajo en esta área ha sido limitado. Se ha demostrado que los embriones cigóticos de la palma de aceite (*Elaeis quineensis* Jacq.), una planta que produce semillas difíciles de alamcenar bajo condiciones convencionales, puede ser almacenada en nitrógeno líquido y sin pérdida de viabilidad, los resultados han sido análizados después de los 8 meses (Grout *et al.*, 1983). Los embriones somáticos de zanahoria (*Daucus carota* L.), han sido recuperados también después del almacenamiento en nitrógeno líquido (Withers, 1979).

Así, potencialmente, se pueden utilizar una amplia variedad de sistemas de cultivo de tejidos para la conservación *in vitro* y para cualquiera de los métodos generalmente utilizados, tanto a corto y mediano plazo como a largo plazo, el sistema debe cumplir como requisito previo a la conservación las siguientes condiciones:

a) Se debe garantizar la estabilidad genética del material preservado. Cuando ésto es factible, la estrategia se basa usualmente en el cultivo de meristemas o yemas apicales como estructuras ideales para el almacenamiento por su relativa estabilidad genética y morfogenética, en

comparación con el cultivo de células y tejidos (Henshaw, 1975; Kartha, *et al.*, 1981 y Withers, 1980). Morel (1975), Henshaw (1982) y Westcott (1981), han señalado las razones para esta consideración: su pequeño tamaño y lento desarrollo.

b) Se deben establecer metodologías bien definidas que garanticen un porcentaje elevado de regeneración de plantas (Roca, 1983). La regeneración a partir del tejido almacenado *in vitro* debe estar plenamente garantizada y tener un grado aceptable de eficiencia. Los factores que determinan una buena respuesta en la regeneración son básicamente los componentes del medio y algunos factores físicos como luz y temperatura. Además, el grado de variación genotípica a nivel de cultivares presenta también diferentes respuestas y es conveniente conocer esta variación para lograr una mayor aplicabilidad en la preservación del genoma de una determinada especie (Westcott, *et al.*, 1977).

2.4.2.1. Métodos De Conservación De Germoplasma *in vitro*.

La conservación de germoplasma *in vitro* puede efectuarse de dos formas: a) Conservación a corto y mediano plazo y b) Conservación a largo plazo o **crioconservación**. Ambas modalidades tienen sus características propias, con ventajas y desventajas.

2.4.2.1.1. Conservación A Corto y Mediano Plazo.

Se refiere a períodos de almacenamiento de germoplasma sin subcultivos de por lo menos un año. Sin embargo, en el estado actual del conocimiento, algunos trabajos se refieren a lapsos más cortos: 3, 6 ó 9 meses, debido básicamente a

que los métodos se encuentran aún en una fase de experimentación. Existen dos enfoques para la conservación de germoplasma a corto y mediano plazo: 1) mantener el cultivo bajo condiciones de crecimiento normal o continuo, o 2) mantener el cultivo bajo condiciones de crecimiento limitado. A continuación se presentan las características de cada uno:

1) El procedimiento conocido para iniciar y mantener un cultivo involucra el establecimiento de un segmento de material de la planta en forma de cultivo aséptico, estimulación del crecimiento y desarrollo, con transferencias periódicas del cultivo a medio fresco.

Las transferencias frecuentes involucran gastos concomitantes. Además, aumentan la posibilidad de pérdidas por contaminación, por error y cambios en el genotipo debido a la inestabilidad genética.

Se sabe que durante los subcultivos ocurren mutaciones y selección, lo que conducirá a la producción de una progenie atípica o inclusive a la pérdida de la totipotencia (Westcott, *et al.*, 1977).

2) La meta más obvia durante el almacenamiento de germoplasma a corto y mediano plazo es establecer las condiciones experimentales que favorezcan un crecimiento mínimo, sin alteraciones de la estabilidad genética, y con subcultivos lo menos frecuentes posibles (Rubluo, 1985).

Al limitar la tasa de crecimiento y extenderse el intervalo de transferencia, se reducen los requerimientos del cultivo (Roca, *et al.*, 1979). Esto puede tener un efecto benéfico en la estabilidad del cultivo, ya que al disminuir la tasa de división celular se estaría reduciendo

la frecuencia de mutación que pudiera ocurrir durante la duplicación del ADN en la fase mitótica del ciclo celular (Henshaw, 1982; Westcott, 1981 y 1984). Sin embargo, los riesgos no se pueden eliminar completamente y la misma técnica puede introducir nuevos riesgos de selección debido al inevitable estrés fisiológico impuesto por el almacenamiento (Westcott, 1981 y Withers, 1980).

Es de suma importancia que los procedimientos que se van a aplicar para minimizar el crecimiento, sean también capaces de mantener una máxima viabilidad de los cultivos. Es decir, que sea factible la recuperación de plantas cada vez que sea necesario.

Teóricamente la recuperación de una planta de cada cultivo sería suficiente, sin embargo, las necesidades prácticas de propagación para reiniciar otro ciclo de conservación, reducir la posibilidad de selección y facilitar el intercambio y la utilización del germoplasma, requieren altas tasas de regeneración (micropropagación) (Roca, 1983).

Existen varios factores físicos y químicos por medio de los cuales se puede limitar el crecimiento:

a) Reducción de la temperatura. El almacenamiento de germoplasma *in vitro* a temperaturas inferiores al valor óptimo para la propagación de la especie, ha sido utilizado con éxito. Sin embargo, en estos casos es necesario considerar los hábitats naturales de las plantas con el fin de definir la temperatura a la cual se inhibe el crecimiento, y así evitar pérdidas posteriores (Rubluo, 1985).

b) Concentración de nutrimentos. El balance nitrógeno/carbono en el medio tiende a favorecer el crecimiento de vástagos o raíces, dependiendo de que su concentración sea alta o baja (Roca, 1983).

c) Uso de agentes osmóticos. Los cambios de concentración dentro y fuera de las células afectan el transporte de nutrimentos y consecuentemente el metabolismo (Waymouth, 1973).

d) Inhibidores de crecimiento. Los retardantes de crecimiento son un grupo de compuestos químicamente no relacionados, los cuales tienen la propiedad de reducir el crecimiento de las plantas. Causan un efecto opuesto a las giberelinas en los procesos morfogenéticos, afectando principalmente el crecimiento del tallo el cual resulta de la acción diferencial en el proceso de división celular en la región subapical (Mora, 1987).

Bajo condiciones *in vitro*, los inhibidores pueden actuar de las siguientes maneras:

1) Induciendo directamente la latencia del órgano, reduciendo el metabolismo celular o previniendo la división celular o nuclear; o 2) disminuyendo la susceptibilidad de la célula al frío, originando un crecimiento reducido, principalmente entrenudos cortos en las plantas. En este caso, los procesos de crecimiento son reducidos al mínimo por limitación de una combinación de factores de crecimiento. Esto puede permitir almacenar cultivos a bajas temperaturas por un período mayor (George, *et al.*, 1984).

2.4.2.1.2. Conservación A Largo Plazo o CRIOCONSERVACION.

La crioconservación se basa en la reducción y subsecuente detención de las funciones matabólicas del material biológico, incluyendo la división celular. Eso se logra disminuyendo la temperatura hasta -196°C, temperatura del nitrógeno líquido. En consecuencia el almacenamiento de las estructuras se puede mantener por períodos indefinidos, con garantía de su estabilidad genética (Kartha, *et al.*, 1981).

La preservación por congelamiento de células, tejidos y órganos vegetales, está más bién en incipiente desarrollo, pero con potencial e implicaciones de importante alcance para la conservación e intercambio internacional de germoplasma. El principio fundamental de la conservación por congelamiento básicamente contempla llevar las células a un estado de metabolismo inactivo o "animación suspendida" al someter los cultivos a temperaturas ultrabajas en presencia de crioprotectores (Bajaj, 1983). Algunas especies pueden ser crioprotegidas reduciendo el contenido neto de agua (un proceso análogo a la maduración de las semillas), previo al congelamiento. El "secado" que ocurre durante la deshidratación, es también un proceso crioprotector en la estricta definición del término. Sin embargo, este término es normalmente aplicado a pretratamientos químicos, sin los cuales muy pocas especies pueden sobrevivir al congelamiento y descongelamiento posterior (Withers, 1980).

Teniendo en mente el amplio rango de experiencias en los cuales los crioprotectores son efectivos, no es de sorprenderse que el rango de éstos sea igualmente amplio, con frecuencia con un incremento en protección siendo

provista por el uso de mezclas. Entre los mecanismos propuestos mediante los cuales los crioprotectores son útiles para disminuir el daño están: la reducción en la tasa de crecimiento y en el tamaño de los cristales de hielo; acción coligativa en la cual la concentración efectiva de solutos en equilibrio con el hielo dentro y fuera de la célula es más bajo; la deshidratación osmótica antes del congelamiento; disminuye el punto de congelación del ambiente intracelular, por lo que se facilita la deshidratación protectora en los estadios tempranos del congelamiento; se incrementa la permeabilidad de la membrana por lo que ayuda para el movimiento hídrico de la célula y la estabilidad de macromoléculas y membranas.

Durante la década pasada fué establecido que plantas completas pueden ser regeneradas a partir de células vegetales, embriones y endospermos (Bajaj, 1981a), anteras, embriones sexuales y meristemos aislados conservados por congelamiento en nitrógeno líquido. Esto ha sido demostrado en un número de especies vegetales, algunas de las cuales incluyen tabaco (*Nicotiana tabacum*, Finkle, *et al.*, 1975; Withers y King, 1980b; Bajaj, 1976; 1977d; Bajaj y Reinert, 1977); zanahoria (*Daucus carota*, Nitzsche, 1978; Withers, 1979, 1980a; Withers y Street, 1977a; 1977b; Mazur y Hartmann, 1979; Finkle, *et al.*, 1975; Latta, 1971; Nag y Street, 1973; Dougall y Wetherell, 1974); petunia (*Petunia hybrida*, Bajaj, 1977d); papa (*Solanum tuberosum*, Henshaw, *et al.*, 1979; Stamp, 1978; Towill, 1979; Bajaj, 1978a); camote (*Ipomea sp.*, Latta, 1971); fresa (*Fragaria x ananassa*, Kartha, *et al.*, 1980; Sakai, *et al.*, 1978); arroz (*Oryza sativa*, Sala, *et al.*, 1979; Cella *et al.*, 1978); yuca (*Manihot esculentum*, Henshaw, *et al.*, 1979; Stamp, 1978; Bajaj, 1977a); caña de azúcar (*Saccharum sp.*, Finkle y Ulrich, 1978; 1978a; 1979; Ulrich, *et al.*, 1979; Chen, *et al.*, 1979); chícharo (*Pisum sativum*, Kartha, *et al.*, 1979).

Algunas de las aplicaciones más obvias y potenciales del almacenamiento por congelación del cultivo de plantas son:

1. Preservación de la uniformidad genética;

2. Conservación de germoplasma importante;

3. Mantenimiento de cultivos (haploides) inestables;

4. Almacenamiento de material libre de enfermedades;

5. Retención del potencial morfogenético;

6. Evita subcultivos periódicos;

7. Economiza mano de obra, medio de cultivo, costos y espacio de almacenamiento;

8. Disminuye el metabolismo y previene el envejecimiento;

9. Permite un intercambio internacional de material más eficiente.

Los trabajos iniciales de crioconservación de *Acer pseudoplatanus* (Nag y Street, 1975a; Sagawara y Sakai, 1974; Withers y Street, 1977a; Withers, 1978; Withers y King, 1980a; 1980b); *Atropa belladona* (Nag y Street, 1975a; 1975b; Bajaj, 1977d; 1979a); *Daucus carota* (Nitzsche, 1978); *Saccharum* sp. (Finkle y Ulrich, 1978a, 1978b; 1979) y *Populus euramericana* (Sakai y Sagawara, 1973); fueron efectuados utilizando callos o células en suspensión. Sin embargo, ya se ha señalado su propensión a la inestabilidad genética, por lo que se ha hecho hincapié en la utilización

de ápices meristemáticos, que son las estructuras ideales para la preservación y que, además, han demostrado tener más resistencia al daño por el proceso de congelación (Rubluo, 1985; Withers, 1980).

Recientemente, la crioconservación ha sido exitosamente aplicada a *Digitalis lanata* (Dietrich *et al.*, 1987); *Malus domestica* (Chiung y Lineberger, 1985); *Asparagus officinalis* L. (Kumu *et al.*, 1983); *Solanum tuberosum* (Towill, 1981, 1984); *Dianthus caryophyllus* L. (Dereuddre *et al.*, 1988); *Fragaria x ananassa* (Sakai *et al.*, 1978); utilizando ápices meristemáticos. *Brassica napus* L. (Charne *et al.*, 1988); empleando microesporas aisladas. *Pisum sativum* (Haskins y Kartha, 1980); *Morus bombycis* Koidz. (Yakuwa y Oka, 1982); *Fragaria x ananassa* (Kartha *et al.*, 1980); *Vaccinium sp.* (Reed, 1989); *Rubus sp.* (Reed y Lagerstead, 1987; 1988); con meristemos ya sea apicales o axilares. *Elaeis guineensis* Jacq. (Engelmann *et al.*, 1985); *Vitchia sp.* y *Howea sp.* (Chin *et al.*, 1988); *Asparagus officinalis* (Uragami *et al.*, 1989); *Araucaria hunstenii* (Pritchard y Prendergast, 1986); haciendo uso de embriones somáticos y cigóticos, y cultivos en suspensión. Así pues, la crioconservación ha tenido éxito en un amplio espectro de especies de plantas (Withers, 1984, cita 42 especies), y se puede esperar confiadamente que este éxito pueda ser ampliado a cualquier material cultivado *in vitro* (Scowcroft, 1984).

La crioconservación de germoplasma ha demostrado ser una alternativa viable para las colecciones de campo en varios cultivos de propagación vegetativa, tales como hule (*Hevea brasilensis*), mango (*Mangifera indica*), aguacate (*Persea americana*), kiwi (*Actinidia sinensis*), genjibre (*Zingiber officinale*), pimienta (*Piper nigrum*) caña de azúcar (*Saccharum* sp.) y por supuesto de importancia potencial para bananos y plátanos (*Musa* spp.); ya que es

mucho más económico que su mantenimiento en condiciones naturales en colecciones de campo y reduce los problemas de contaminación de germoplasma por patógenos.

La conservación de germoplasma *in vitro* con los métodos de la criobiología, es un área relativamente nueva. Sin embargo, se han efectuado avances sustanciales debido a las perspectivas que esta metodología ofrece (Withers, 1980). El estudio de la crioconservación para el mantenimiento de germoplasma debe crecer a fin de que llegue a ser rapidamente un recurso para el mantenimiento de la diversidad genética.

Un interés considerable ha tenido lugar sobre el desarrollo de los protocolos para la crioconservación del cultivo de tejidos y células vegetales. A partir de estos estudios, se han desarrollado algunas reglas básicas generales concernientes a las técnicas (Withers, 1986). Los esfuerzos considerados en la crioconservación de tejidos en cultivo y células vegetales han sido divididos en 6 pasos, el primero de los cuales es el estado de precrecimiento. Las condiciones bajo las cuales un cultivo es regenerado precidiendo inmediatamente el almacenamiento *in vitro* puede con frecuencia influenciar su habilidad para sobrevivir a la crioconservación. Para meristemas y ápices, un período de 1 ó 2 días de crecimiento entre la disección y el congelamiento incrementa grandemente las oportunidades de sobrevivencia. Por ejemplo, un período de precrecimiento de 2 días bajo la luz, fué encontrado como escencial para la sobrevivencia de ápices de *Solanum tuberosum* L. almacenado en nitrógeno líquido (Towill, 1981). Además, el medio de cultivo puede ser suplementado con crioprotectores durante la fase de precrecimiento. El dimetil sulfóxido (DMSO) es un aditivo efectivo para el precrecimiento para meristemas, mientras que 6% de manitol o 10% de prolina es generalmente

añadido al medio de precrecimiento de cultivos en suspención.

El segundo estado de la crioconservación es la crioprotección. Durante este estudio, la solución crioprotectora es agregada al cultivo, la cual sirve para disminuir el punto de congelamiento de las células y reducir el daño debido a la formación de cristales de hielo. Los compuestos crioprotectores pueden ser usados solos o en mezclas. Una solución de 5 a 15 % de DMSO es el crioprotector más efectivo para meristemos y ápices meristemáticos. Para cultivos en suspención, la crioprotección es usualmente provista por una mezcla de DMSO y glicerol, con sucrosa, sorbitol, manitol y prolina, frecuentemente añadidos como un tercer componente. La molaridad de la mezcla debe ser de alrededor de 2 molar (Reed, 1989).

En el tercer estado de la crioconservación, los cultivos son congelados. Los especímenes son transferidos a recipientes apropiados, las ámpulas de plástico son los viales más comunmente utilizados. El enfriamiento inicial es generalmente llevado a cabo a una tasa lenta (0.5-2° C/min); sin embargo, el enfriamiento rápido (50-200° C/min)puede ser usado para especímenes sin protección (Engelmann *et al.*, 1985; Yakuwa y Oka, 1988; Chin, *et al.*, 1988; Pritchard y Prendergast, 1986). El congelamiento lento permite que ocurra una deshidratación celular y de esta manera, reduce la formación de hielo intracelular. También el enfriamiento a tasas lentas puede ser dañino si resulta en una deshidratación excesiva; ésto puede evitarse terminando el congelamiento lento con una inmersión directa en nitrógeno líquido una vez que ha ocurrido una deshidratación adecuada. La tasa óptima de sobrevivencia varía entre especies. Por ejemplo, la tasa óptima de

sobrevivencia de ápices de *Fragaria* ocurrió cuando la tasa de enfriamiento fué de 0.85° C/min (Kartha *et al.*, 1980), pero para los ápices de *Pisum*, la tasa óptima fué de 0.6° C/min (Withers, 1986).

El cuarto estado de la crioconservación es el alamcenamiento de los cultivos. Los cultivos congelados deben ser almacenados a temperaturas suficientemente bajas para impedir la migración de hielo. Para almacenamiento a corto y mediano plazo puede ser satisfactorio almacenar los cultivos de -80 a -100° C. Sin embargo, para almacenamiento a largo plazo es mejor almacenar los cultivos en un tanque de nitrógeno líquido a -196° C o bajo vapores de nitrógeno a -150° C (Reed, 1989).

El quinto estado en la crioconservación, el descongelamiento de los especímenes congelados, es un estado crítico. Tanto para meristemas/ápices y cultivos en suspención, el descongelamiento rápido es superior al descongelamiento lento. El descongelamiento rápido puede ser llevado a cabo sumergiendo el recipiente que contiene el espécimen congelado, en un recipiente de agua estéril a 40° C agitando hasta que la solución crioprotectora y el tejido estén descongelados. El cultivo es luego llevado a la temperatura ambiente. Los especímenes sin protección son descongelados en medio líquido a 25-30° C (Reed, 1989).

El estado final de la crioconservación es la estimación de la viabilidad. Las tres pruebas de viabilidad más comunmente usadas son, tinción con diacetato de fluoresceina, coloración con azul de Evans o la reducción de 2,3,5-cloruro trifenil tetrazolio (prueba TTC), siendo solamente la prueba de TTC apropiada para especímenes grandes (Reed, 1989).

2.5 El Género *Musa*-Un Recurso Genético Importante.

2.5.1. Generalidades.

Los bananos (AAA) y plátanos (AAB), (*Musa spp.*) son una fuente de carbohidratos, la más común para millones de personas en los trópicos húmedo y sub-húmedo.

En la década pasada, el efecto más dramático que afectó la producción de banano y plátano ha sido la aparición y diseminación de enfermedades y plagas tales como las foliares en las que se encuentran formas más virulentas de Sigatoka. El agente causal de la Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis* Mulder & Stover; es un hongo el cual ataca las hojas, reduciendo la cosecha hasta en un 30 a 50 % (Stover, 1983; INIBAP, 1987a). El mosaico del banano y plátano (*Cucumber Mosaico Virus* C.M.V.), según Champion y Okumo se considera que se trata del virus "A del pepino", que infecta un gran número de vegetales (Rosero y Jurado, 1978). Entre las enfermedades del pseudotallo y rizoma se puede mencionar la enfermedad del Moko (*Pseudomonas solanacearum*) que después de la Sigatoka, es la enfermedad de mayor importancia económica (Rosero y Múnera, 1977). Por otra parte, uno de los mayores problemas en los cultivos de banano y plátano, a escala mundial, son los nemátodos (López, 1976; Torres, 1973; Jurado y López, 1976). Los problemas nematológicos en los cultivos de plátano y banano son causados, fundamentalmente por las siguientes especies *Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae* y *Meloidogyne sp.* solo por mencionar los más importantes (Rosero, 1987).

Estos problemas han apuntado un gran esfuerzo internacional hacia el mejoramiento genético de este importante cultivo. Hasta la fecha, el mejoramiento

genético de los bananos ha estado diseminado en diferentes países y organizaciones con muy poca relación entre sí, las colecciones de germoplasma se han mantenido más por interés de grupos científicos que de organizaciones gubernamentales.

Algunos países como Jamamica (Banana Board), Honduras (Unites Fruit Co.), Filipinas (Los Baños), Nueva Guinea (LAU), India (Coimbatore) y Taiwan tienen importantes colecciones de germoplasma, con el propósito de usar estos clones para mejorar sus cultivares (Soto, 1990). De importancia primordial a estas tentativas de mejoramiento es la selección, conservación y movimiento del germoplasma. Sin embargo, dado que muchos cultivares de *Musa* son evidentemente estériles y por lo tanto deben ser propagados vegetativamente, se han presentado varias dificultades:

·El intercambio de germoplasma está limitado por los largos períodos de cuarentena que los propágulos vegetativos convencionales deben someterse debido a su riesgo innato de diseminar plagas y enfermedades (Chiarappa y Karpati, 1984; Stover, 1977).

·La conservación de germoplasma en colecciones de campo está en riesgo de sufrir desastres naturales o por enfermedad, y requiere aportes sustanciales de espacio y mano de obra (De Langhe, 1984).

·Bajas tasas de multiplicación por medios convencionales, limitan la rápida diseminación de cultivares seleccionados y resistentes a enfermedades.

En el pasado, el mejoramiento de *Musa* ha sido basado en un número limitado de colecciones de germoplasma. Ninguna de estas colecciones estuvo, incluso, rodeada de una variabilidad representativa. Esto fué debido a que las

colecciones fueron formadas de una manera conveniente a los intereses entonces en boga, de los científicos que hacían uso de ellas (Williams, 1986).

En la estructura conceptual para la concervación, son necesarios métodos adecuados para la propagación, para multiplicar las existencias a través de subcultivos. Cualquiera que fuese el método utilizado, lo cierto es que los genetistas dependen de la variabilidad existente y los tipos silvestres de banano y plátano. Actualmente, la conservación de este recurso es una acción prioritaria para disponer así de una fuente de genes que pueden ser importantes en el mejoramiento futuro de bananos y plátanos. Por eso existe la necesidad de conservar esta variabilidad mediante la recolección y establecimiento de colecciones, que contengan el germoplasma necesario para su estudio y utilización en programas de fitomejoramiento.

2.5.2. Clasificación Taxonómica.

De acuerdo con Simmonds (1948; 1962), las musáceas pertenecen a la clase de las monocotiledóneas, al orden Zingiberales y a la familia Musaceae, la cual incluye los géneros *Musa* y *Ensete*. El género *Musa* se divide en cuatro secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys y Eumusa. Esta última sección comprende a las especies *M. acuminata* y *M. balbisiana*. El número básico cromosómico para la sección Eumusa es de n=11. Las musáceas comestibles usualmente se dividen en dos tipos: bananos y plátanos. Tuvieron su origen en dos especies silvestres, *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* que son diploides.

La ploidía y el genomio de cada cultivar está representado con A para indicar la procedencia de *Musa acuminata* y con B para la de *Musa balbisiana*. De esta

manera las letras A y B sirven para la clasificación e identificación de cultivares (Stover y Simmonds, 1987). Es posible encontrar cultivares diploides AA y triploides AAA, que son los dos tipos de banano cultivado, mientras que los plátanos son híbridos entre las dos especies ancestrales, con genoma AAB, existe otro grupo dentro del que se encuentra "Pelipita" y "Saba", con genoma ABB (Champion, 1968; Simmonds, 1962); también existen tetraploides (AAAA).

Los bananos constituyen una de las pocas frutas en las cuales los cultivares desarrollados mediante métodos de mejoramiento controlado no han reemplazado a aquellos que se producen a través de la evolución natural (Rowe, 1985).

Los frutos del banano muestran dos vías fundamentales de desarrollo (Simmonds, 1962). En las especies seminíferas silvestres, la polinización es escencial para el desarrollo del fruto y en estado adulto, éste contiene gran número de semillas rodeadas de una pulpa escasa que se desarrolla en las paredes y tabiques del ovario (Soto, 1990).

Los bananos comestibles, en marcado contraste con los anteriores, desarrollan sus frutos por partenocarpia vegetativa, o sea que desarrollan una masa de pulpa la cual se forma a partir del borde exterior del lóbulo (Simmonds, 1973). La polinización no tiene efecto alguno sobre el desarrollo del fruto del banano comestible exceptuando el hecho de que propicia el desarrollo del ovario; y es probable que la gran mayoría de los frutos comestibles de banano no reciban polen alguno. Así, la partenocarpia y la esterilidad son fenómenos diferentes, causados por mecanismos genéticos parcialmente independientes.

El hecho de que la mayoría de los frutos de banano sean estériles, es decir, sin semillas, se debe a un complejo de causas, es probable que los genes específicos de esterilidad femenina, la triploidía y el cambio estructural cromosómico sean todos responsables en distintos grados de esta condición dependiendo de la importancia relativa de los mismos en los diferentes clones (Simmonds, 1973; Dodds y Simmonds, 1948).

En orden de importancia económica y comercial los cultivares son triploides, diploides o tetraploides.

Los cultivares triploides ocurren casi siempre porque además de mostrar un racimo más conveniente presentan la combinación más económica de las partes vegetativas del racimo, además los triploides y tetraploides tienen un desarrollo vegetativo más fuerte que los diploides, el volúmen de las partes florales y de los frutos es mayor, son vegetativamente partenocárpicos.

Los tetraploides tienen un desarrollo vegetativo más fuerte que los diploides y hasta mejor que los triploides pero el volúmen del fruto es menor comparado con éste último (De Langhe, 1969).

Los diploides no son adecuados pues el tamaño deseado, y en términos generales, el vigor de la planta, dependen de niveles más altos de ploidía. Igualmente, aunque la esterilidad femenina puede ser mejorada en los diploides, La presencia de polen viable ocasionalmente daría frutos con semilla. Además no todos son partenocárpicos.

2.5.3. Historia Del Cultivo *in vitro* De *Musa*.

La propagación clonal rápida del germoplasma de *Musa* fué la principal aplicación práctica de la técnica del cultivo de tejidos vegetales (George y Sherrington, 1984). Otras aplicaciones importantes han sido, la erradicación de enfermedades y la conservación e intercambio de germoplasma (De Langhe, 1984; Withers y Williams, 1985).

Estos fueron también los objetivos de las primeras aplicaciones del cultivo de tejidos de *Musa*. Los primeros reportes de plantas de banano producidas por cultivo de ápices meristemáticos *in vitro*, vinieron de Taiwan y China a principios de los años 70's (Ma y Shii, 1972; 1974; Ma *et al.*, 1978). Berg y Bustamante (1974), en Honduras, usaron el cultivo de meristemas combinado con termoterapia, para producir bananos libres de virus. Un equipo en la Universidad de Filipinas produjo ápices de banano *in vitro* para inducción de mutación por medio de irradiación (De Guzmán *et al.*, 1976; 1980). Los primeros reportes fueron basados en investigaciones llevadas a cabo sobre un número muy limitado de cultivares de banano de *Musa* AAA, principalmente tipos Cavendish.

A partir de 1980, sin embargo, un amplio rango de especies y cultivares de *Musa* de todas las constituciones genómicas, han sido encontradas óptimas para el cultivo *in vitro* de ápices (Cronauer y Krikorian, 1984a; 1984b; Jarret *et al.*, 1985; Müller y Sandoval, 1986; Novak *et al.*, 1986; Sun, 1985; Vessey y Rivera, 1981; Vulsteke, 1983; Vulsteke y De Langhe, 1985; Wong, 1986; Zamora, *et al.*, 1986). Las tasas de multiplicación *in vitro* tienen magnitudes más altas que la propagación convencional pero la producción de plantas *in vitro* está limitada por el efecto de genotipo, espectro hormonal, etc.

En los últimos diez años se han publicado gran cantidad de trabajos referentes a la multiplicación *in vitro* de musáceas (Banerjee y De Langhe, 1985; Cronauer y Krikorian,1984; Jarret *et al.*, 1985; Krikorian y Cronauer, 1983; Vulsteke y De Langhe, 1985). El método consiste en lograr el establecimiento y el desarrollo de pequeños ápices meristemáticos en un medio artificial aséptico. Se han investigado varios medios; predominan los de consistencia semisólida y no los líquidos (Sandoval y Müller, 1987). El de más amplia aseptación es el basal de Murashige y Skoog (M. S., 1962), en ocasiones modificado.

En *Musa* la escasez de plántulas para el establecimiento de nuevas plantaciones y la utilización de propágulos infectados con virosis y en especial por nemátodos, representan una seria desventaja productiva (Krikorian y Cronauer, 1983). En este sentido el cultivo de tejidos es una herramienta útil que posibilita: a) transferir al campo material sano, b) disponer de material de siembra en cualquier época del año, c) multiplicar aceleradamente genotipos deseables, d) transportar fácilmente los propágulos y uniformar las plantaciones y cosechas (Krikorian y Cronauer, 1983).

En la micropropagación de *Musa*, son posibles dos rutas de producción de brotes: axilar y adventicia (Jarret, 1986). La multiplicación mediante la estimulación de brotes "axilares" está supeditada al número de yemas preexistentes (Jarret, 1986). La capacidad de multiplicación decrece conforme aumenta la frecuencia de subcultivos. Se espera que individuos propagados por yemas "axilares" muestren alta estabilidad genética (Jarret, 1986). En contraste, la multiplicación vía brotes adventicios implica diferenciación *de novo* a partir de tejidos adultos, que inician un patrón de dediferenciación hacia tejido meristemático. A partir de

éste, se forman brotes adventicios, de los cuales se desarrollan luego plantas (Jarret, 1986). La tasa de multiplicación, usando brotes adventicios, es alta, con el inconveniente de que existe mayor posibilidad de obtener variabilidad genética (Jarret, 1986). Por otra parte Escalant (comunicación personal, 1990), propone la existencia del tejido meristemático, *per se* lo que implica una gran estabilidad genética en los embriones somáticos generados de éste tejido.

De la misma manera, los primeros ensayos que han sucedido para la obtención de embriones somáticos a partir de callos derivados de ejes florales (Shrinivassa Rao *et al.*, 1982), base de la hoja y explantes de la hoja (Cronauer y Krikorian, 1984c) dieron en principio rizogénesis en el tejido. Esta opinión fué validada por Bakry y Rossignol (1985), sin embargo, el cultivo de callos embriogenicamente competentes que habían sido iniciados y el subsecuente desarrollo de embriones había sido inhibido como resultado de una deficiencia hormonal o de otros nutrientes. Escalant y Teisson (1988), obtuvieron embriones somáticos a partir de embriones cigóticos de semillas diploides resultado de la hibridización interespecífica de *M. balbisiana* y *M. acuminata ssp. microcarpa* y observaron la extraordinaria fidelidad fenotípica de los embriones somáticos con los embriones cigóticos y la presencia de un haustorio muy semejante en los embriones somáticos. Finalmente Escalant y Teisson (1989), obtuvieron embriones somáticos a partir de callos obtenidos de embriones cigóticos inmaduros de especies seminíferas diploides de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* e igualmente observaron una perfecta homología en sus estructuras (epidermis, sección cotiledonar, eje apical, y tres primordios radicales).

El establecimiento en campo de plantas de banano y plátano a gran escala propagados *in vitro*, ha sido reportado en Taiwan, China (Hwang *et al.*, 1984), Filipinas (Epp, 1987; Zamora *et al.*, 1986), Australia (Johns, 1985), Costa Rica (Jarret *et al.*, 1985), Jamaica (Oglesby y Griffis, 1986; Stover, 1987), Puerto Rico (Pool e Irizarry, 1987), Islas Virgenes, E.U.A. (Ramcharan *et al.*, 1987), Israel (Reuven *et al.*, 1985), Marruecos (Kenny y Aaouine, 1987), Camerún (C. Teisson, com. pers., 1987, citado por Vulsteke, 1989) y Nigeria (IITA, 1986; Vulsteke *et al.*, 1988). El germoplasma de *Musa* en cultivo de tejidos ha sido intercambiado internacionalmente desde la primera mitad de la década de los 80's (Jarret *et al.*, 1985; Zamora *et al.*, 1986). Desde 1985, el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) en Ibadán, Nigeria, ha usado exitosamente el cultivo de meristemas para intercambio de germoplasma interregional e internacional; más de 120 especies y cultivares de *Musa* han sido introducidos y sobre 100 distribuidos en muchas partes del mundo (IITA, 1988).

2.6. Estabilidad Genética *in vitro*.

Uno de los aspectos cruciales del cultivo *in vitro* para la propagación clonal y la conservación de germoplasma es el mantenimiento de la estabilidad genética. Sin embargo, la variación somaclonal, la cual es la variación genética entre plantas regeneradas a partir de cultivo de tejidos de un solo clon progenitor, parece estar bien difundido. Es un impedimento potencial para la propagación *in vitro*, conservación e intercambio de germoplasma (Scowcroft, 1984).

Durante los últimos años, varios reportes de variación entre plantas de *Musa* micropropagadas han sido presentadas y éstas confirman que es un fenómeno común. Generalmente se utilizan ambos términos "variación fenotípica" y "variación

somaclonal" para describir la variabilidad del cultivo inducido el cual es, con seguridad, de origen genético (Vulsteke, 1989). Esto está determinado por monitoreos si las características variantes son 1) transmitidas a través de al menos dos generaciones, y/o 2) si consisten entre progenies que siguen un ciclo de multiplicación clonal convencional *in vivo* (Vulsteke *et al.*, 1988). Reportes de frecuencias de variaciones fuera de tipo van desde 2.4% (Hwang, 1986) hasta 25-30% (Müller y Sandoval, 1987; Stover, 1987) o aún tan alto como 38% (Ramcharan *et al.*, 1987). Aunque éstas son frecuencias relativamente altas para plantas regeneradas de cultivos de ápices, el espectro de fenotipos variables no es muy amplio.

2.6.1. El Bagaje Genético De Los Diploides.

En relación a la conservación de germoplasma de *Musa*, parece probable que las medidas de conservación tales como preservación de germoplasma como una biblioteca genómica total no sea justificado actualmente como ideal (aunque esté disminuyendo). La diversidad genética existe sin duda en las especies progenitoras diploides fértiles, cuyas semillas son ortodoxas y así pueden ser conservadas por vía de técnicas convencionales. Parece probable que el rango de variación para cualquier caracter dado, agricolamente importante, será encontrado en mayor magnitud en los diploides silvestres, que en los clones cultivados. Es bien conocido que estas especies (*M. acuminata* y *M. balbisiana*) y las varias subespecies de *M. acuminata* son todas interfértiles. Si la conservación de la diversidad genética es el objetivo principal, entonces la colección y mantenimiento de estos diploides debe ser un objetivo prioritario en el futuro inmediato. Además, el hecho de que estos materiales son fértiles y se presten para estudios de genética clásica, origina la investigación fundamental y

aplicada, orientada al mejoramiento del cultivo con *Musa acuminata* y los híbridos interespecíficos. La diseminación de las semillas hará que estos materiales estén disponibles rápidamente (IBPGR, 1986)

2.7. Conservación De Germoplasma De *Musa spp*.

El procedimiento *in vitro* consiste en establecer una metodología que limite la tasa de crecimiento vegetativo, con la finalidad de extender el lapso entre subcultivos (Scowcroft, 1984). Para tal efecto, es necesario el manejo y utilización de factores físicos (intensidad de luz, fotoperíodo y temperatura) o químicos (nutrimentos orgánicos e inorgánicos, reguladores de crecimiento, concentración osmótica del medio) que proporcionan las condiciones óptimas para el almacenamiento de germoplasma a corto y mediano plazo (Roca, 1983).

Algunas de las técnicas utilizadas para el almacenamiento de germoplasma *in vitro* de *Musa* son (Sandoval y Müller, 1989):

1.- Utilización de baja temperatura

2.- Uso de osmorreguladores

3.- Inhibidores químicos

4.- Criopreservación.

Muy poca investigación ha sido realizada en la crioconservación del tejido en cultivo de *Musa* y la técnica no ha sido aplicada exitosamente. Banerjee (1985), reportó un ensayo en crioconservación de bananos por el método de congelamiento ultrarápido (Kartha *et al.*, 1982) y por congelamiento en seco (Withers, 1979). Los niveles de sobrevivencia de 80-90% fueron alcanzados cuando el congelamiento fué terminado después de 15-30 minutos a -20° C. Los cultivos expuestos a temperaturas debajo de -20° C invariablemente murieron. Ahora bien, más recientemente Panis *et al.* (1990), empleando cultivos en suspensión obtuvieron hasta un 46% de regeneración de callo, con ocacionales formaciones de embriones somáticos.

Este estudio permitirá ampliar los conocimientos en cuanto a crioconservación se refiere, además de aportar un acercamiento novedoso concerniente al comportamiento de los embriones cigóticos de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata* bajo condiciones de crioconservación y el papel que juegan distintos factores sobre la sobrevivencia y recuperación de tan importante material genético.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Facilidades Del Laboratorio.

La totalidad de la investigación y experimentación se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos de la unidad de biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza-CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Se instaló especialmente el laboratorio de crioconservación con el equipo básico para realizar el trabajo experimental.

3.2. Material Vegetal Estudiado.

El material vegetal experimental consistió en embriones cigóticos maduros de semillas diploides de *Musa acuminata* ssp. *burmaniccoides* (Calcutta 4) y de *Musa balbisiana* (Figura 1).

3.2.1 Especies, Cultivares y Genoma.

Para la obtención de embriones cigóticos, se empleó material de las especies *Musa acuminata ssp. burmaniccoides* (AA) y *Musa balbisiana* (BB), procedentes de la colección de musáceas del CATIE. En ambas especies, fué el estadío de madurez completa el que se empleó para todos los experimentos debido a que en éste, los embriones presentaron una mayor capacidad de germinación comparado con los embriones inmaduros. Esto se determinó realizando pruebas preliminares de viabilidad a varios estadíos de desarrollo de los embriones cigóticos de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, para establecer el estadío en que la viabilidad pudiera ser facil e inmediatamente detectable transcurridas las fases de crioprotección y crioconservación sobre el

explante; por técnicas sencillas de desarrollar tal como la técnica de reducción de cloruro 2,3,5-trifenil tetrazolio donde se cuantificó el número de embriones que se habían teñido de rojo.

Tomando en cuenta que la fertilización ocurrió inmediatamente que las flores habían emergido, se consideró, de acuerdo a De Langhe (1961), que la edad de los embriones era similar al número de días que habían transcurrido posterior a la polinización. Empíricamente, se han empleado el número de bracteas de la parte masculina del raquis que se han levantado, como un indicativo proporcional con respecto al número de días transcurridos a partir de la polinización, entendiéndose que puede existir un rango de error de más o menos 4 días que unicamente un estudio histológico puede precisar. Así pues, para este ensayo y dado lo anterior, se utilizaron los siguientes estadios:

	ESPECIE									
	Musa balbisiana					*Musa acuminata*				
Días de Madurez	45	55	65	75	85	40	50	60	70	80

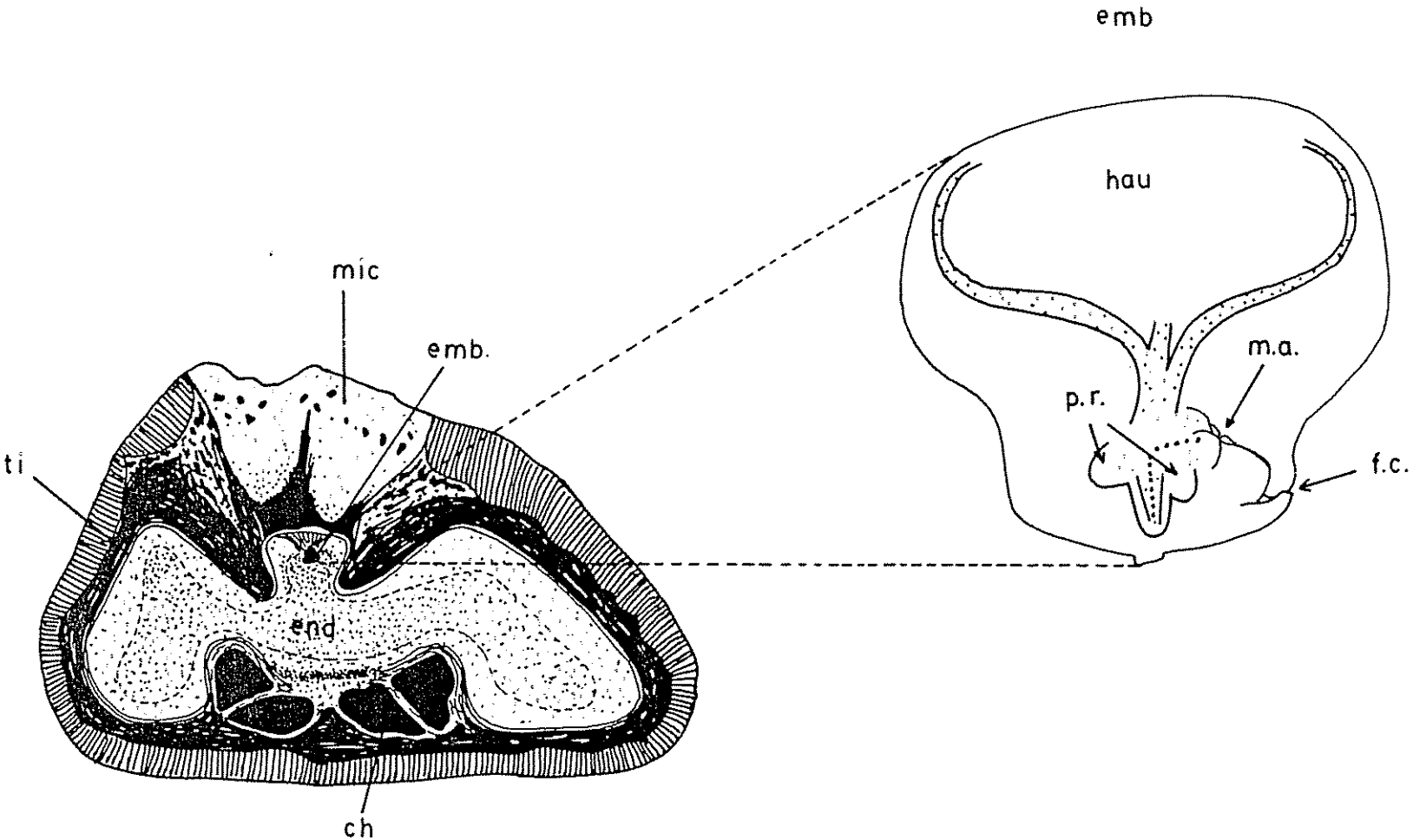


Figura 1. CORTE ESQUEMATICO DE UNA SEMILLA Y DE UN EMBRION DE *Musa*

mic=micrópilo, emb=embrión, end=endospermo, ti=tegumento interno, ch=chalaze, p.r.=primordio radical, m.a=meristemo apical, hau=haustorio

3.3. Desinfección y Aislamiento De Los Embriones Cigóticos.

Una vez separados los frutos del racimo siempre con mucho cuidado de no dejar las semillas expuestas, se lavaron con detergente y cepillo al chorro del agua. Posteriormente se eliminaron los extremos, una vez más sin exponer las semillas. Los frutos se sumergieron en alcohol al 70% por tres minutos después de los cuales se eliminó éste y se adicionó hipoclorito de sodio (NaClO) al 8% manteniendo el material en él por espacio de 20 minutos removiendo con frecuencia. Pasado este tiempo, se eliminó el hipoclorito y se enjuagó el material abundantemente con agua destilada. Seguidamente se agregó hipoclorito de sodio, esta vez al 6% durante 15 minutos.

El material se trasladó a la cámara de flujo laminar y se enjuagó por lo menos 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, se eliminó la cáscara con sumo cuidado para tener acceso a las semillas. Se procedió al aislamiento de los embriones con la ayuda del estereoscopio (Escalant y Teisson, 1987).

Una vez esterilizado el material, los embriones fueron extraídos y ubicados en medio básico de Murashige y Skoog (1962), con vitaminas de Morel y 60 gl de sacarosa, lo que permite mantener al embrión en una fuerte presión osmótica (Norstog, 1961).

3.4. Medio De Cultivo.

El medio de cultivo estuvo compuesto de los elementos minerales de Murashige y Skoog (M.S., 1962), donde los macroelementos fueron diluídos dos veces, vitaminas de Morel (1950), 60 g/l de sacarosa y 2 g/l de gelrite . El pH fué ajustado a 5.8 previo a la esterilización en la autoclave (Escalant y Teisson, 1987).

Las modificaciones realizadas al medio basal M.S., lo constituyeron los tratamientos de la presente investigación, para las cuales se emplearon dos designaciones: El medio de germinación, el cual consistió en el medio basal original aunado a los reguladores de crecimiento bencil adenina (BA) y ácido absícico (ABA). El medio de pretratamiento, se distinguió del de germinación, por las elevadas concentraciones de sacarosa que fueron empleadas.

Se prepararon soluciones madre de macroelementos, microelementos, vitaminas de Morel, para facilitar la preparación de los medios. En matraces aforados se adicionaron, alícuotas de las soluciones madre y los reguladores para el medio de germinación. Para los medios de pretratamiento, se añadieron alícuotas de las soluciones madre además de las diferentes concentraciones de sacarosa. Se mezclaron con la ayuda de un agitador magnético y se aforó al volúmen deseado con agua destilada. Una vez incorporados todos los componentes requeridos, se ajustó el pH a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH) o con ácido clorhídrico (HCl). Posteriormente los medios se esterilizaron en una autoclave a una presión de 1.05 kg.cm^2 (121° C) durante 20 minutos.

Los medios se dispensaron en tubos de cultivo tipo "kaput" que contenían alícuatas de 10 ml del medio sólido respectivo. Se inoculó un explante por tubo.

Medio de Pretratamiento.

Para la etapa de pretratamiento, el medio consistió en el medio básico original, salvo las distintas concentraciones de sacarosa:

0.20 M	68.46	g/l
0.30 M	102.69	g/l
0.50 M	171.15	g/l
0.75 M	256.72	g/l

Medio de Germinación con Reguladores.

El medio fué provisto de BA (0.5 mg/l) y de ABA (1 mg/l).

3.5. Ensayos Preliminares Con Crioprotectores.

Para definir los crioprotectores en sus distintos tiempos y concentraciones a ser utilizados en la fase de pretratamiento de los embriones cigóticos, se efectuaron una serie de ensayos preliminares, tanto a temperatura ambiente, como bajo congelamiento en nitrógeno líquido. Tales pruebas consistieron en lo siguiente:

a) Incremento en las Concentraciones de Sacarosa.

La sacarosa es junto con el glicerol, un crioprotector metabolisable y fuente de energía, el cual, tiene características de osmorregulador, opresor osmótico y en altas concentraciones, disminuye la división celular.

El empleo de la sacarosa en los ensayos preliminares de este trabajo fué utilizada incrementando las concentraciones cada 24 horas desde 0.2, 0.3, 0.5 y 0.75 M. De tal forma, se realizó el aislamiento de embriones en dos ensayos de 100 embriones cada uno, los que sufrieron un incremento sucesivo en la concentración de este crioprotector. Esta prueba se realizó tanto para la especie *Musa acuminata* como para *Musa balbisiana*.

Transcurrido el tiempo estipulado en cada una de las concentraciones, se tomó una muestra del 10 % de la población y se realizó la prueba de viabilidad a los embriones, con 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC), al 0.5 %, durante 15 horas (Towill y Mazur, 1975), para así conocer en qué concentración era afectada la viabilidad y en qué porcentaje sucedía ésta.

Por otra parte, el mismo ensayo fué realizado, pero sometiendo a los embriones a congelamiento directo a 0.75 M de sacarosa donde la prueba de viabilidad fué realizada una vez que los embriones se encontraron en medio con 0.2 M de sacarosa.

b) Efecto en la Combinación de Crioprotectores.

En esta etapa se examinó el efecto de algunos de los compuestos crioprotectores más usados en el pretratamiento de embriones previo a su congelamiento.

b.1. En una primera prueba, los compuestos y concentraciones fueron, el DMSO al 0, 5 y 10 % con tiempos de incubación de 24 y 48 horas, en medio M. S. con dos concentraciones de sacarosa, 0.2 M y 0.75 M. Para utilizar la concentración 0.75 M, los embriones sufrieron los incrementos ya establecidos anteriormente, todo lo anterior ocurrió a 27°C +/- 2°C. La determinación de la viabilidad fué realizada con TTC al 0.5 %.

De la misma manera que el experimento anterior, los embriones fueron congelados en un ensayo posterior y la viabilidad fué determinada 24 horas después que los embriones gueron ubicados en medio con 0.2 M de sacarosa.

b.2. La segunda prueba de combinación de crioprotectores se dividió en 3 tipos de pretratamientos diferentes, sin embargo, el punto coincidente, fué la utilización de una solución vitrificante para los tres casos. Los pretratamientos se describen a continuación.

1.- Se incrementó la concentración de sacarosa sobre los embriones desde 0.2 M hasta 0.75 M con los incrementos ya descritos. El material biológico fué ubicado en los viales criogénicos con la solución vitrificante por 10 minutos, previo al congelamiento. La solución vitrificante consistió en 22 % de glicerol, 15 % de etilen glicol y 7 % de DMSO. El material fué introducido directamente en nitrógeno líquido durante 1 hora y más tarde descongelado a 40°C en baño maría por 2 minutos. Una vez descongelado el material, éste se ubicó en medio con 0.75 M de sacarosa para iniciar con las concentraciones descendentes.

2.- El segundo pretratamiento, consistió en aumentar la concentración de sacarosa de 0.2 M a 0.75 M. Ahora bien, en la concentración 0.75 M, el medio fué enriquecido con 10 % de DMSO y los embriones permanecieron en éste durante 24 horas. De esta manera, los embriones fueron ubicados más tarde en la solución vitrificante para luego ser congelados y descongelados y finalmente disminuir las concentraciones de sacarosa.

3.- El tercer y último pretratamiento, fué similar al anterior con excepción que durante la concentración 0.75 M da sacarosa fué añadido 12 % de etilen glicol. El resto del proceso sucedió de manera similar.

Los ensayos testigos en todos los casos fueron los embriones aislados sin tratamiento y los embriones tratados sin congelamiento.

3.6. Crioconservación De Embriones Cigóticos.

3.6.1. Condiciones De Pretratamiento.

Inicialmete, todos los embriones aislados fueron dispuestos en el medio básico sin reguladores de crecimiento.

Los tipos de pretratamientos consistieron en elevar sucesivamente la concentración de sacarosa cada 24 horas partiendo de 0.2 M, 0.3, 0.5, hasta 0.75 M. Finalmente, una nueva adaptación en el protocolo generalizado de crioconservación fué realizado, consistiendo en la deshidratación del tejido en forma natural (sin sustancias osmóticas), dentro de la cámara de flujo de aire estéril. Esta inovación de la eliminación del contenido hídrico celular surgió de la técnica empleada para el almacenamiento de semillas y básicamente consistió en distintos tiempos de deshidratación (Chin, *et al.*,1988; Pritchard y Prendergast,

1986). Así mismo, se combinó con los incrementos de sacarosa para aumentar las posibilidades de éxito en la supervivencia y recuperación del material. Una vez más, la prueba de viabilidad en la fase de recuperación del explante se llevó a cabo con TTC.

Los embriones inoculados en los tubos se colocaron en un cuarto de crecimiento de ambiente controlado a una temperatura de 27° C +/- 2° C. Todos los cultivos fueron iniciados en la oscuridad ya que el fitocromo que es activado a la luz, inhibe la germinación del embrión (Escalant, comunicación personal, 1990)

3.6.2. Congelamiento-Descongelamiento.

Para el congelamiento, los embriones tratados con crioprotectores, fueron transferidos a ámpulas de polipropileno con tapón de rosca de una capacidad de 2.0 ml con medio de cultivo, similar al del pretratamiento, es decir, con concentraciones de 0, 5 y 10% de DMSO y de 0.2 M y 0.75 M de sacarosa. Por otra parte, para los embriones deshidratados, el congelamiento ocurrió sin ningún tipo de solución crioprotectora.

Los viales fueron sumergidos directamente en nitrógeno líquido (-196° C) durante 1 hora, tiempo considerado como suficiente para la prueba ya que la velocidad de congelamiento del nitrógeno líquido es de 200° C/min, por lo que el tejido alcanza la temperatura del nitrógeno líquido (-196° C) en menos de un minuto. Después del almacenamiento, las ámpulas fueron descongeladas en baño maría a 40° C durante 2 minutos para evitar la formación de cristales de hielo en las células y por lo tanto un daño irreparable sin mayor posibilidad de recuperación del explante.

3.6.3. Recuperación.

El explante fué ubicado más tarde en medio de acuerdo al tratamiento que correspondía culminando en medio basal de germinación con 1 mg/l de ABA o con 0.5 mg/l de BA o ya sea sin regulador de crecimiento para probar su mejor recuperación y germinacion.

3.6.4. Tratamientos.

Se realizaron 3 métodos de crioconservación para cada una de las dos especies, los cuales constaron de 5 pretratamientos. Para cada tratamiento se inocularon 100 embriones, todo lo anterior con 3 repeticiones para cada cultivar además de sus respectivos testigos los cuales fueron: a) embriones sin pretratamiento y sin congelamiento; b) embriones sin pretratamiento con congelamiento; c) embriones pretratados sin congelamiento y, d) embriones pretratados y congelados.

3.6.4.1. Descripción De Los Tratamientos.

Los tratamientos consistieron básicamente en lo siguiente:

Una vez aislados los embriones de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata*, fueron pretratados para su resistencia al congelamiento y posterior recuperación de la siguiente manera:

TRATAMIENTO 1). Se probaron distintas tasas de deshidratación de los embriones cigóticos, a saber, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 horas. Los embriones fueron dispuestos en cajas Petri estériles dentro de la cámara de flujo de aire estéril. Transcurrido el tiempo establecido, los embriones fueron ubicados en viales criogénicos estériles, sin ningún tipo de solución crioprotectora y se introdujeron directamente al tanque con nitrógeno líquido. El material

fué crioconservado por espacio de 1 hora, El proceso de congelamiento y descongelamiento prosiguió de la manera ya descrita. Finalmente, los embriones fueron sembrados en medio adecuado para su recuperación y germinación.

TRATAMIENTO 2). Se deshidrató el material durante los mismos tiempos anteriormente señalados, prosiguiendo con el proceso de congelamiento y descongelamiento. Una vez que los embriones fueron descongelados, se procedió a efectuar un incremento en las concentraciones de sacarosa (0.2, 0.3, 0.5, 0.75 M) con transferencias sucesivas del material cada 24 horas en cada una de las concentraciones. Cuando se hubo llegado a la concentración máxima de sacarosa, se procedió a realizar la disminución de ésta en la misma forma, es decir, con transferencias cada 24 horas hasta llegar a la concentración 0.2 M, considerada como óptima para la recuperación y germinación del embrión.

TRATAMIENTO 3). Aumentando la concentración de sacarosa (0.2, 0.3, 0.5, 0.75 M) cada 24 horas y posteriormente deshidratando el tejido (2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 horas), ubicandose los embriones en los viales criogénicos, continuando con el congelamiento y descongelamiento del material. Una vez descongelados los embriones se procedió a efectuar la disminución de las concentraciones de sacarosa a intervalos de 24 horas en cada transferencia para su recuperación.

3.7. Análisis De Sobrevivencia.

Una vez llegado a la fase de cultivo en medio de germinación, los embriones fueron tratados con 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) a una concentración de 0.5 % y debidamente esterilizado por filtración. Los embriones se pusieron en contacto con esta solución durante 15 horas (Steponkus y Lanphear, 1967; Towill y Mazul, 1974b; Withers,

1978a; Cela *et al.*, 1979); transcurridas éstas, se tomaron los registros pertinentes para conocer el porcentaje de viabilidad y finalmente fueron colocados en medio de germinación para comprobar si su poder germinativo estaba aún presente. Las observaciones de germinación se realizaron 45 días después, verificando si los embriones habían sobrevivido y en tal caso si mostraban capacidad de germinación.

3.8. Análisis Histológico.

Los embriones más contrastantes con respecto a su respuesta a la crioconservación, fueron elegidos para efectuar análisis histológico. Los cortes del tejido se realizaron en resina y la interpretación fué realizada bajo el microscopio de luz. Las diferentes respuestas de los embriones a la crioconservación y que fueron sometidos a estudio histológico fueron las siguientes:

Gran Control

Fueron embriones que habían sido aislados y puestos a germinar en medio básico de germinación, con el fin de tener un punto de comparación para el resto de los embriones en tratamiento.

Control Embriones Deshidratados Sin Congelamiento.

El estudio de este tratamiento control fué realizado con el fin de conocer si la etapa de pretratamiento definiría la posibilidad de una futura recuperación. Es

decir, comprobar la severidad del pretratamiento y los daños ocacionados en el explante, previo al congelamiento.

Embriones No Sobrevivientes.

Los embriones que presentraron este comportamiento, fueron considerados como tales tras transcurrir 45 días en medio de germinación después del congelamiento-descongelamiento, éstos permanecieron blancos. Los embriones que se mantienen blancos, no germinan jamás y la actividad fenoloxidativa es pues, una prueba precoz del poder germinativo de los embriones.

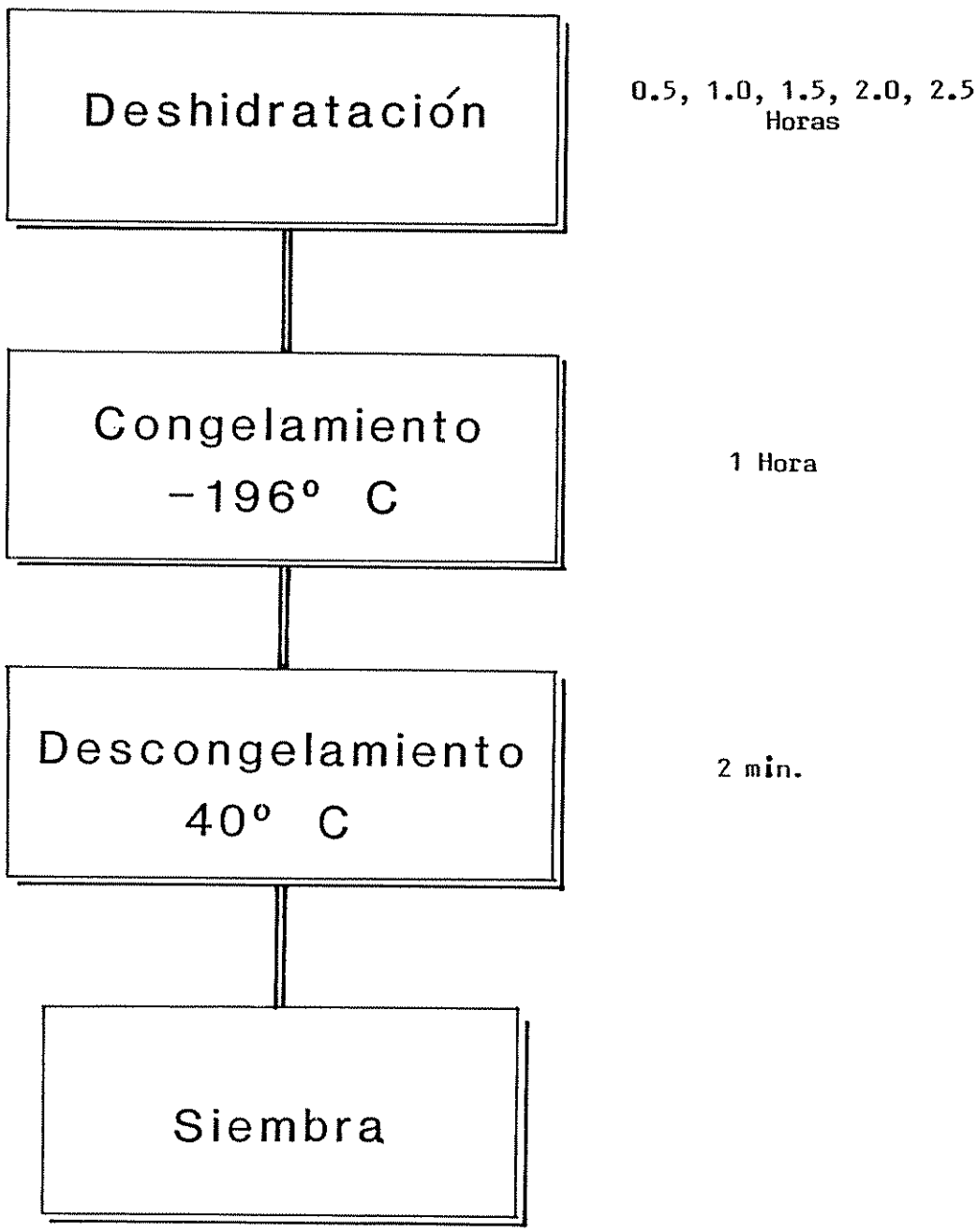
Embriones Sobrevivientes Sin Germinación.

La característica de estos embriones fué que, tras encontrarse en medio de germinación posterior a la etapa de congelamiento-descongelamiento, mostró indicios de sobrevivencia por producción de fenoles, sin embargo no había brotes aparentes.

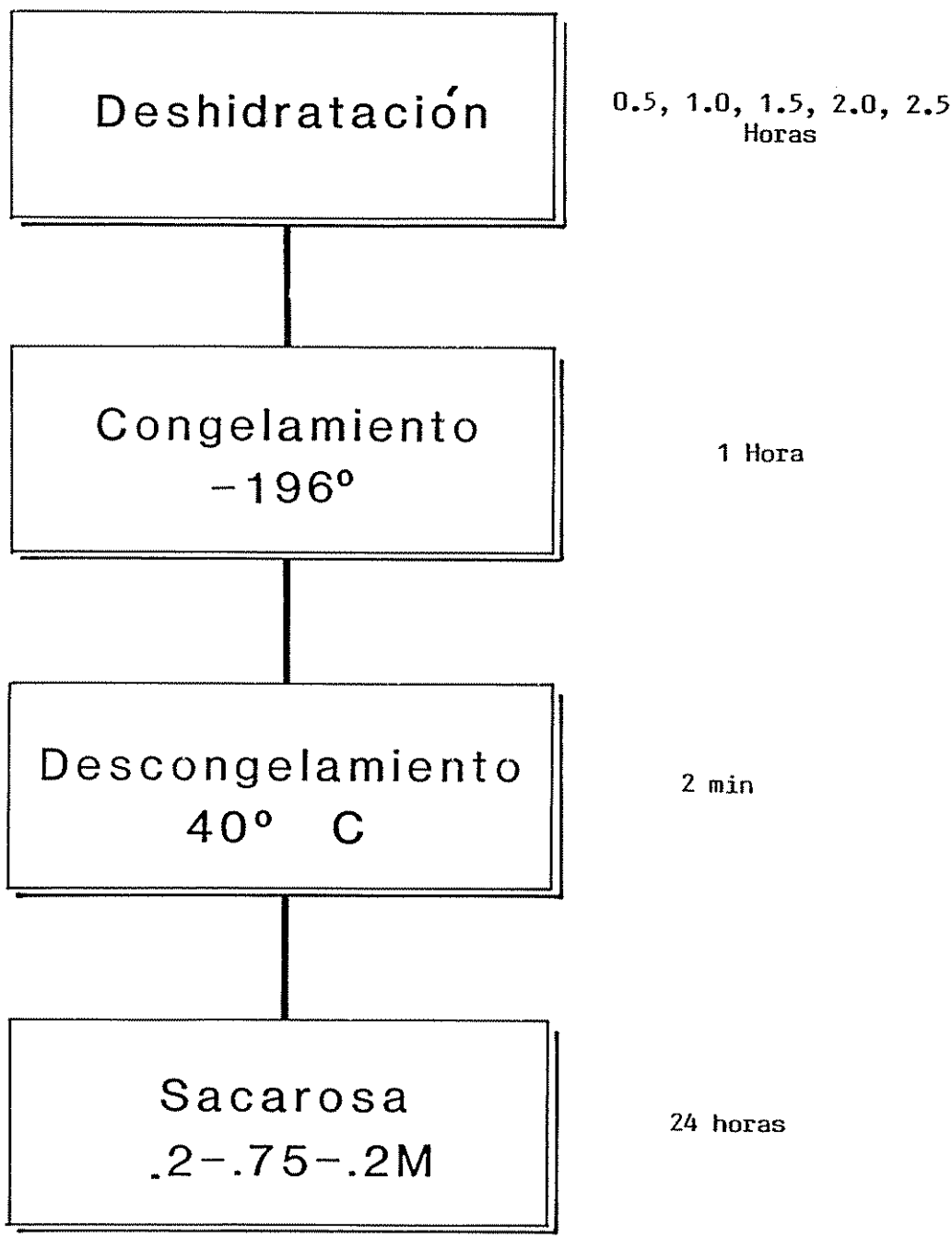
Embriones Sobrevivientes Y Germinando.

Los embriones que entraron en este rango fueron aquellos que hubieron evidentemente germinado, induciendo el crecimiento del meristema apical del epicotilo y del primordio radical.

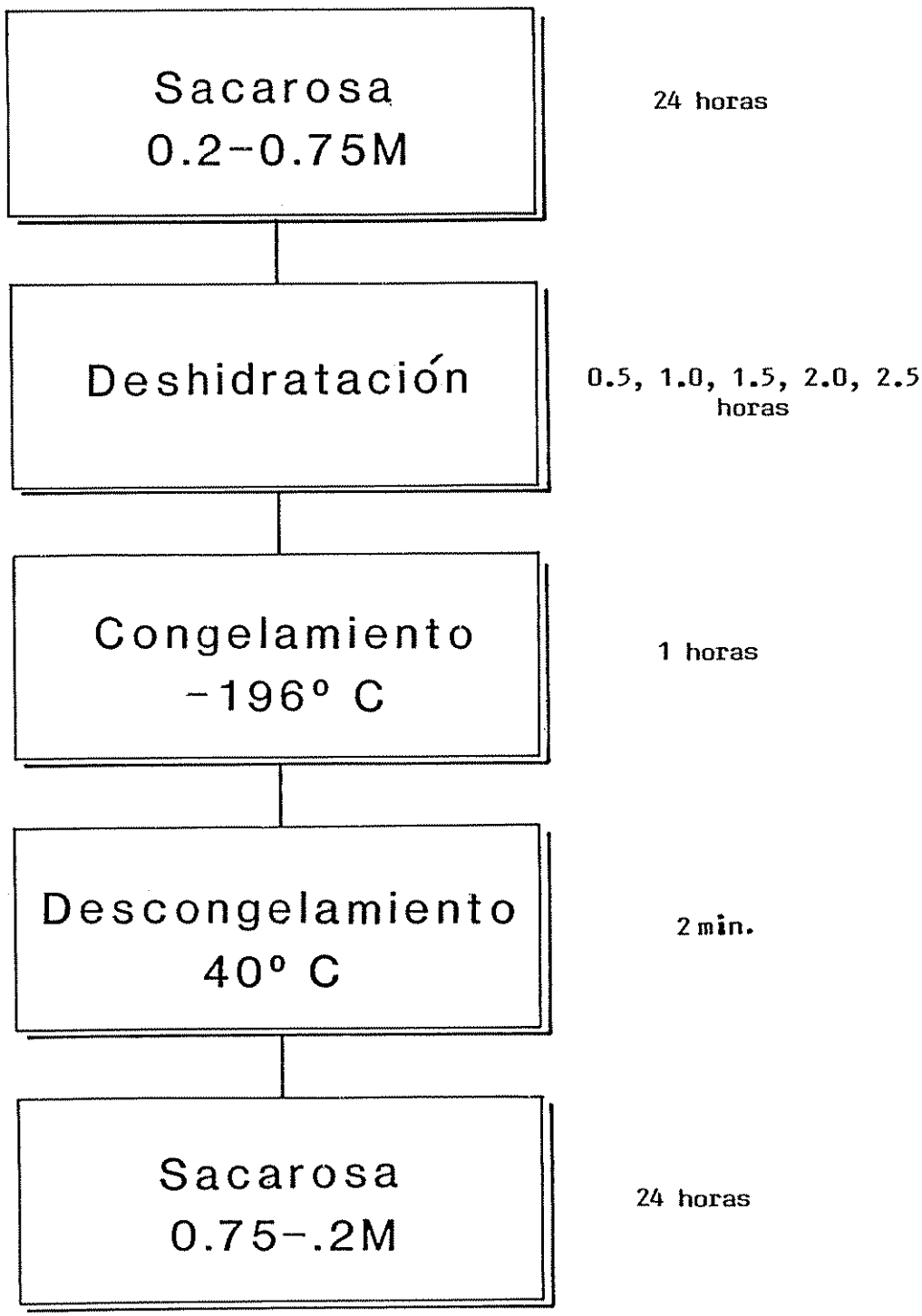
TRATAMIENTO 1



TRATAMIENTO 2



TRATAMIENTO 3



4. R E S U L T A D O S.

4.1. Determinación Del Estado De Madurez Del Embrión Para Crioconservación.

Los ensayos preliminares para establecer el estadío en que la viabilidad del embrión pudiera ser detectable, posterior al descongelamiento del explante, con TTC, arrojaron por resultado que: únicamente los estadíos más avanzados de desarrollo del embrión, en ambas especies, respondieron positivamente a la prueba de TTC.

Para *Musa balbisiana*, a partir de 65 días posteriores a la polinización, fué que los embriones se encontraron en condiciones óptimas de reducción de TTC. Así mismo, para *Musa acuminata*, es a partir de los 70 días posteriores a la polinización que los embriones lograron la reducción del TTC. Si bien, se hubiese podido trabajar con estos estadíos, se prefirió emplear embriones aún más maduros, debido a que se requería de material lo más homogéneo posible, situación que no sucedía con los embriones de un estado de madurez menor. Así pues, para *Musa balbisiana* se emplearon embriones de 80-90 días y para *Musa acuminata* ssp. *burmaniccoides* (Calcutta 4), 130 días.

4.2. Ensayos Preliminares Con El Uso De Crioprotectores.

Las primeras pruebas con crioprotectores fueron realizadas empleando altas concentraciones de sacarosa y se obtuvo que, para la especie *Musa balbisiana*, el incremento en la concentración de sacarosa no afectó la viabilidad de los embriones desde 0.2 M hasta 0.75 M y de ahí nuevamente hasta 0.2 M siendo la viabilidad de los embriones de un 100% (Figura 2).

Para *Musa acuminata* se presentó un porcentaje de viabilidad al realizar la prueba de TTC, de un 100% en las concentraciones 0.2 y 0.3 M, sin embargo, para la concentración 0.5 M la viabilidad disminuyó a un 80% y a 0.75 M la viabilidad se redujo a un 50% de los embriones pretratados (Figura 3).

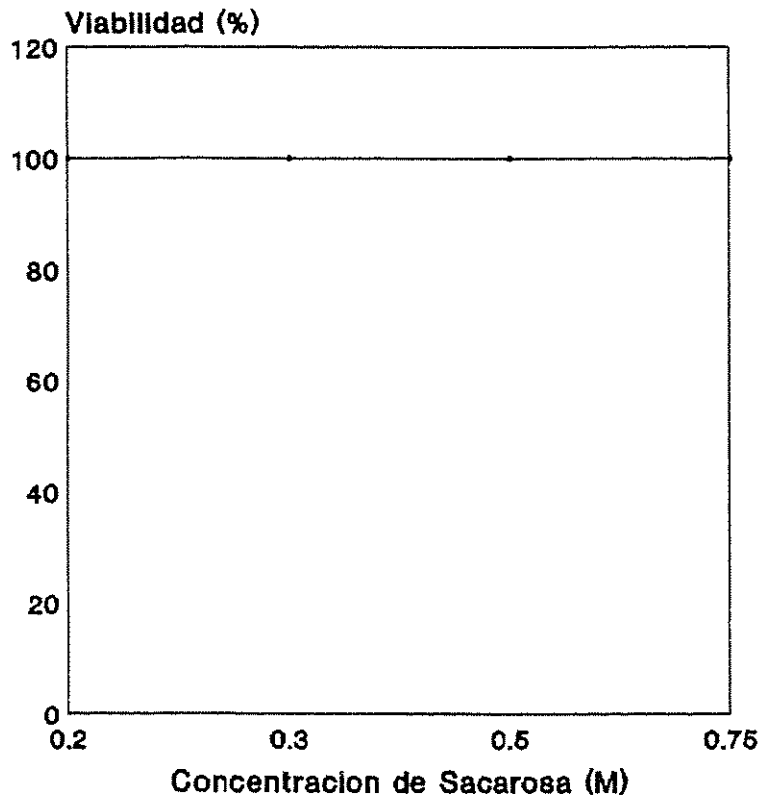
Por otro lado, en todas las concentraciones de DMSO y sus combinaciones con sacarosa en el tiempo de incubación de 24 horas, se observó un 100% en la viabilidad, germinación y desarrollo del embrión de *Musa balbisiana*, no siendo así en el período de incubación de 48 horas, cuando en las concentraciones 5 y 10% de DMSO se observó una disminución de hasta un 50% (Cuadro 1).

En cambio, para *Musa acuminata*, el porcentaje se redujo más rapidamente aún en el período de incubación de 24 horas y a concentraciones idoneas de sacarosa. Al 5% de DMSO la viabilidad se redujo de un 80-50% y al 10% el explante no sobrevivió a ningúna de las concentraciones de sacarosa ni a ningún tiempo de incubación.

El tercer pretratamiento desrrollado y que consistió en la deshidratación de los embriones a distintos tiempos y posteriormente rehidratados, indicaron una sobrevivencia del 100% y una recuperación perfecta con la subsecuente germinación del embrión.

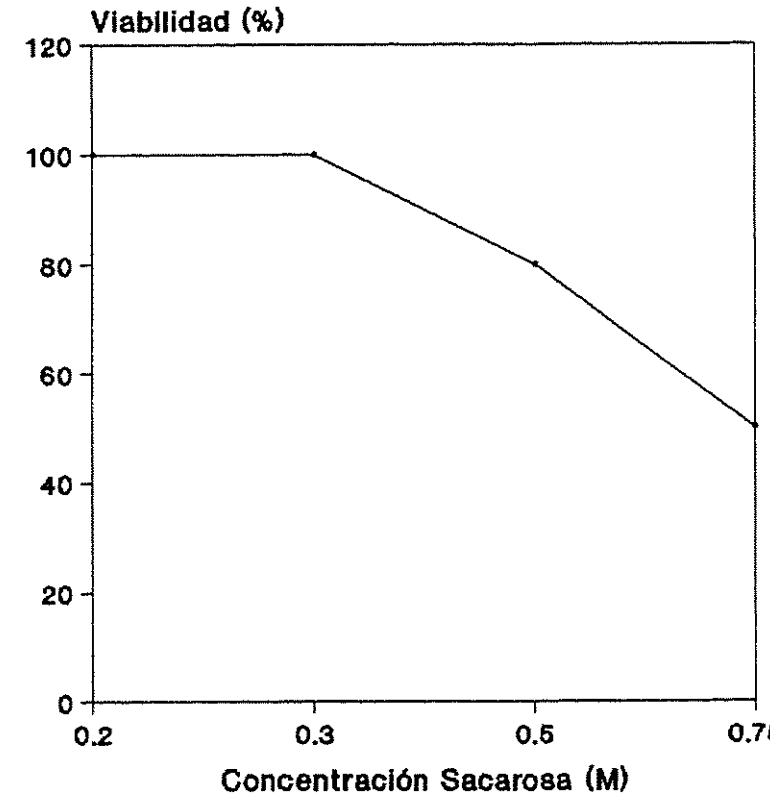
Una vez que se obtuvieron estos valores, se procedió a realizar ensayos de congelamiento rápido en nitrógeno líquido.

Figura 2



Efecto de la Concentración de Sacarosa Sobre la Tasa de Viabilidad de los Embriones de *Musa balbisiana.*

Figura 3



Efecto de la Concentración de Sacarosa Sobre la Tasa de Viabilidad de los Embriones de *Musa acuminata.*

Cuadro 1. Respuesta de sobrevivencia de embriones cigóticos de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata* al pretratamiento con crioprotectores.

DMSO	SACAROSA	PERIODO DE INCUBACION	% EMBRIONES VIABLES *M. balbisiana*	*M. acuminata*
0%	0.2M	24	100.0	100.0
		48	100.0	100.0
	0.75M	24	83.3	50.0
		48	100.0	50.0
5%	0.2M	24	100.0	75.0
		48	66.6	80.0
	0.75M	24	100.0	50.0
		48	50.0	60.0
10%	0.2M	24	100.0	0.0
		48	66.6	0.0
	0.75M	24	100.0	0.0
		48	50.0	0.0

4.3. Ensayos Preliminares De Congelamiento De Embriones Con Crioprotectores y Sin Ellos.

En los ensayos preliminares de congelamiento para los embriones de ambas especies pretratados con crioprotectores, no hubo sobrevivencia de los embriones en todos y cada uno de los casos. Por otra parte, y a diferencia de lo anterior, fué el congelamiento de los embriones deshidratados en sus diferentes tiempos los que proporcionaron resultados más optimistas y que dieron lugar, al establecimiento de los distintos tratamientos cuyos resultados a continuación se describen.

4.4. Sobrevivencia De Los Embriones Dentro De Cada Tratamiento.

Para la especie *Musa balbisiana*, el porcentaje de sobrevivencia que se obtuvo por tratamiento, no tuvo variación para cada uno de los tiempos que conformaron los pretratamientos de deshidratación.

El análisis de varianza para la sobrevivencia de los embriones de *Musa balbisiana* muestra valores no significativos y da una clara evidencia de que los tratamientos proporcionaron resultados muy similares (Figura 4).

A pesar de los resultados obtenidos en la ANDEVA, se realizó la prueba de Duncan para los tiempos de deshidratación, con respecto a la sobrevivencia, mostrando dos diferencias básicas que son los extremos, es decir, el tiempo de deshidratación ideal fué el pretratamiento 2 horas de deshidratación en el que se obtuvo el 70 % de sobrevivencia y el tiempo de deshidratación que aportó una tasa de sobrevivencia mínima fué el de 0.5 horas de deshidratación conun porcentaje medio de 42.5 % (Cuadro 2). Los tiempos de deshidratación restantes no presentaron diferencias entre ellos, ni con los tiempos extremos que sí proporcionaron diferencia significativa. Sin embargo, en el tiempo de deshidratación 2.5, horas que entra en el rango de la no diferencia en los porcentajes de sobrevivencia, sí se puede apuntar que sus valores van en disminución (Figura 5).

Se observó que entre las repeticiones efectuadas en cada pretratamiento, la fluctuación en los resultados estuvo presente en todos los tiempos, con excepción del pretratamiento de 2 horas de deshidratación, que presentó una ocurrencia más homogenea de los eventos (Apéndice).

La crioconservación de *Musa acuminata* presentó resultados controversiales, debido a su variabilidad de los valores de sobrevivencia.

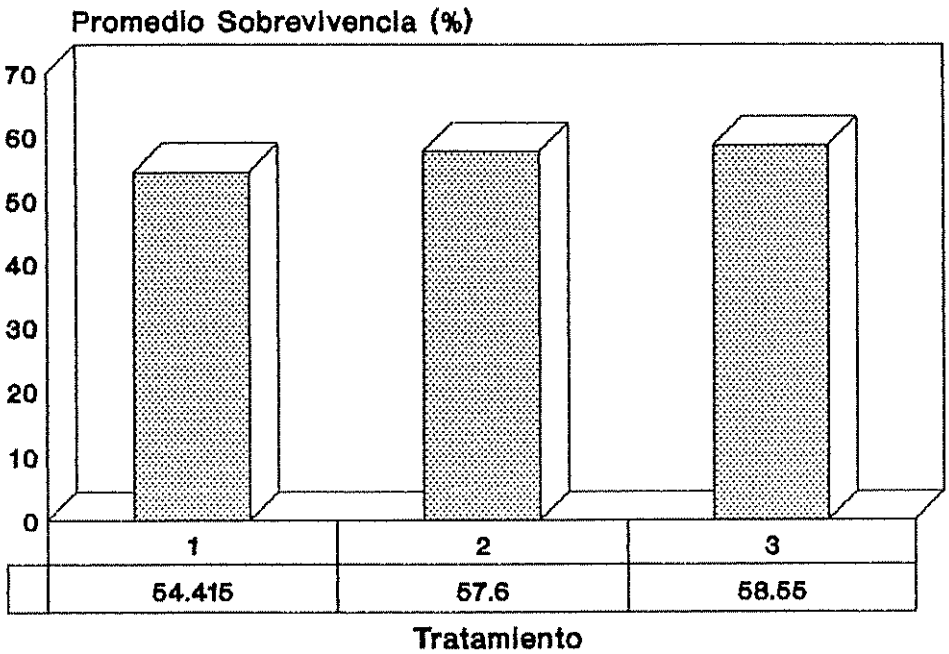


FIGURA 4. PROMEDIO DE SOBREVIVENCIA POR TRATAMIENTO DE *Musa balbisiana.*

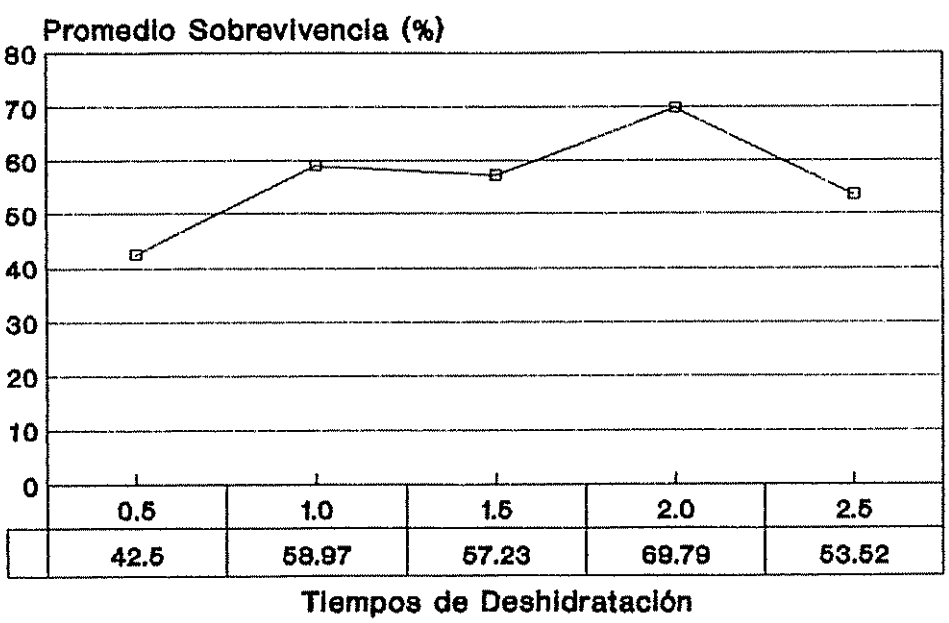


FIGURA 5. PROMEDIO DE SOBREVIVENCIA POR TIEMPO DE DESHIDRATACIÓN DE *Musa balbisiana.*

Cuadro 2. Resultados de la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad de los tiempos de deshidratación con respecto a la sobrevivencia de los embriones cigóticos de *Musa balbisiana*.

TIEMPO DE DESHIDRATACION	MEDIA DE SOBREVIVENCIA	GRUPO DUNCAN
2	69.79	A *
1	58.79	AB
1.5	57.23	AB
2.5	53.52	AB
0.5	42.50	B *

* Letras distintas indican diferencias estadisticamente significativas al 5 %.

Cuadro 3. Análisis de varianza para la sobrevivencia de los embriones cigóticos de *Musa acuminata* en los diferentes tratamientos y tiempos de deshidratación.

FUENTE	G. L.	C. M.	PR F	C. V.
Tratamiento	2	1639.57	0.0003 **	21.32 %
Deshidratación	4	2710.22	0.0001 **	
Trat*Desh	8	1012.84	0.0001 **	
Error	26	142.94		
Total	40			

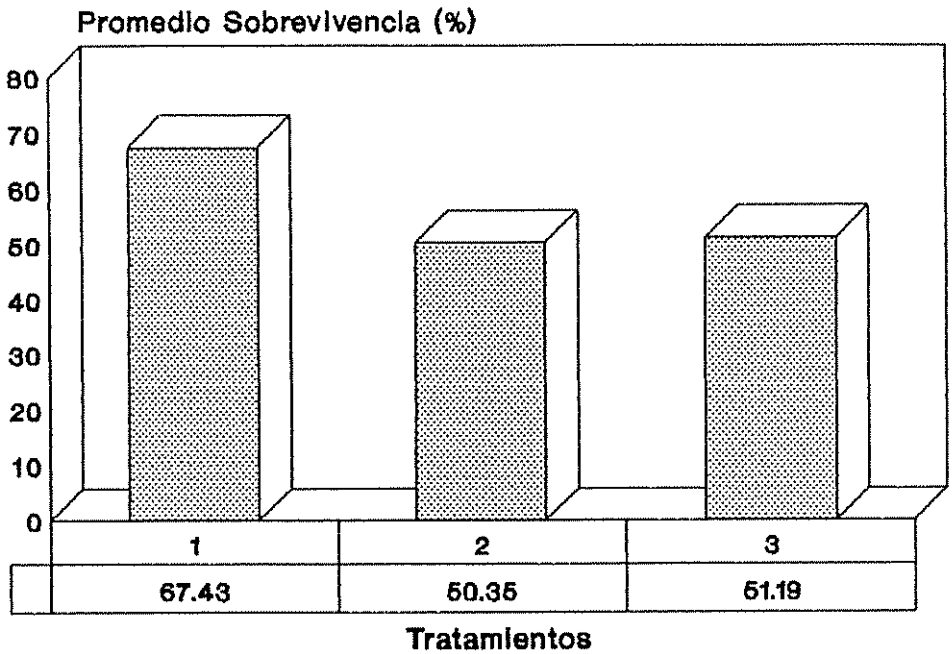


FIGURA 6. PROMEDIO DE SOBREVIVENCIA POR TRATAMIENTO *DE Musa acuminata.*

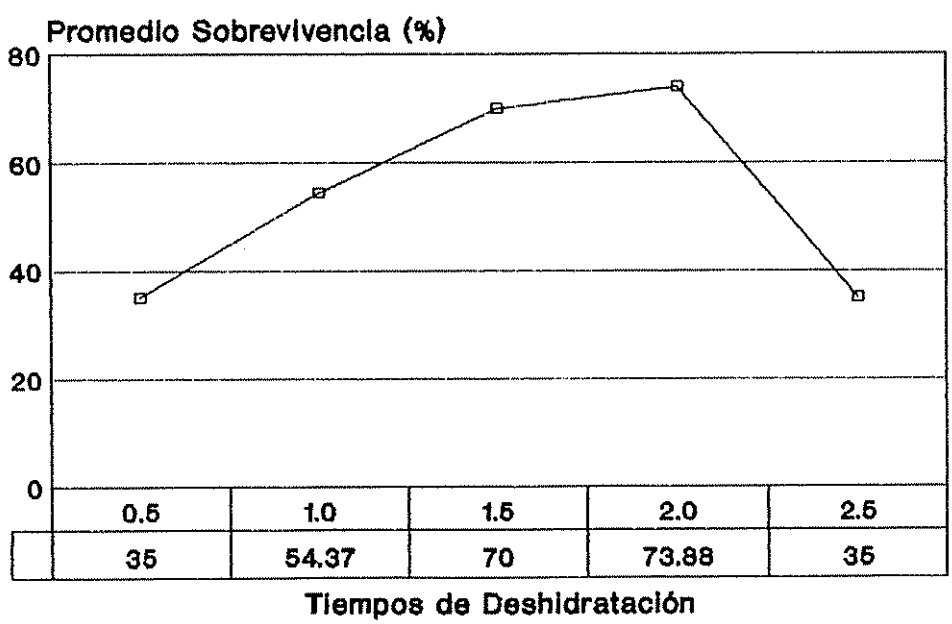


FIGURA 7. PROMEDIO DE SOBREVIVENCIA POR TIEMPOS DE DESHIDRATACION DE *Musa acuminata.*

El análisis de varianza para la sobrevivencia de los embriones cigóticos de *Musa acuminata* (Cuadro 3), posterior al congelamiento de cada uno de los tratamientos y tiempos de deshidratación, presentó valores altamente significativos para tratamiento y deshidratación, por lo que se procedió a realizar las pruebas de Duncan correspondientes.

Las diferencias entre el tratamiento 1 y el tratamiento 2 y 3 (Figura 6), corroboran los resultados de los ensayos preliminares en los que *Musa acuminata* se ve afectada en su viabilidad y sobrevivencia en presencia de altas concentraciones de sacarosa (Cuadro 4).

Se realizó una prueba de Duncan para conocer el mejor tiempo de deshidratación en el que la sobrevivencia era mayor (Cuadro 5), obteniendo 3 diferencias básicas en las respuestas de sobrevivencia de los embriones de *Musa acuminata*, siendo los tiempos más importantes 2 horas y 1.5 horas con un porcentaje de sobrevivencia de 73.88 y 70.00 % respectivamente. Las otras dos diferencias corresponden por un lado, al pretratamiento 1 hora y por otro, al pretratamiento 0.5 horas de deshidratación. Por su parte, el pretratamiento 2.5 horas no tuvo diferencia significativa entre los pretratamientos 0.5 y 1.0 horas de deshidratación (Figura 7).

Cuadro 4. Prueba de Duncan al 5 % de probabilidad de los diferentes tratamientos con respecto a la sobrevivencia de los embriones cigóticos de *Musa acuminata*.

TRATAMIENTO	MEDIA DE SOBREVIVENCIA	GRUPO DUNCAN
1	67.43	A *
2	51.19	B
3	50.35	B

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 5. Prueba de Duncan al 5 % de probabilidad de los diferentes tiempos de deshidratación con respecto a la sobrevivencia de embriones de *Musa acuminata*.

TIEMPO DE DESHIDRATACION	MEDIA DE SOBREVIVENCIA	GRUPO DUNCAN
2.0	73.88	A *
1.5	70.00	A
1.0	54.37	B *
2.5	44.79	BC
0.5	35.00	C

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

4.5. Germinación De Los Embriones.

En el ANDEVA para la germinación de los embriones cigóticos de *Musa balbisiana* dentro de los 3 tratamientos y 2 medios de germinación, a= BA y b= ABA (Cuadro 6); proporcionó valores de "F" no significativos, lo que demuestra que, tanto el medio que contiene BA, como el que fué enriquecido con ABA, no representaron ninguna diferencia estadística en cuanto al incremento en la germinación en ninguno de los tres tratamientos.

Para la especie *Musa balbisiana*, se presentó una tendencia a mostrar una germinación superior con ABA en el tratamiento 1 y en el tratamiento 2 seguidos por el medio que contenía BA en los mismos tratamientos. El tratamiento 3 por su parte arrojó los valores más bajos de germinación en los dos tipos de medio de germinación (Figura 8). No se presentó diferencia significativa, ni estadística, ni cuantitativa, en cuanto a la influencia de los tiempos de deshidratación sobre la capacidad de germinación (Figura 9).

La germinación de la especie *Musa acuminata*, no fué evaluada debido a la gran heterogeneidad de las respuestas en los tres tratamientos.

Cuadro 6. Prueba de Duncan al 5 % de probabilidad de los diferentes tratamientos con respecto a la germinación de los embriones cigóticos de *Musa balbisiana*.

TRATAMIENTOS	MEDIA DE GERMINACION	GRUPO DUNCAN
1b**	68.33	A*
2b	67.49	A
1a	59.80	A
2a	58.33	A
3b	57.64	A
3a	44.30	A

* Las letras iguales indican que no son estadisticamente significativas.

** El primer número corresponde al tratamiento y el segundo, al medio de germinación: a= BA; b= ABA.

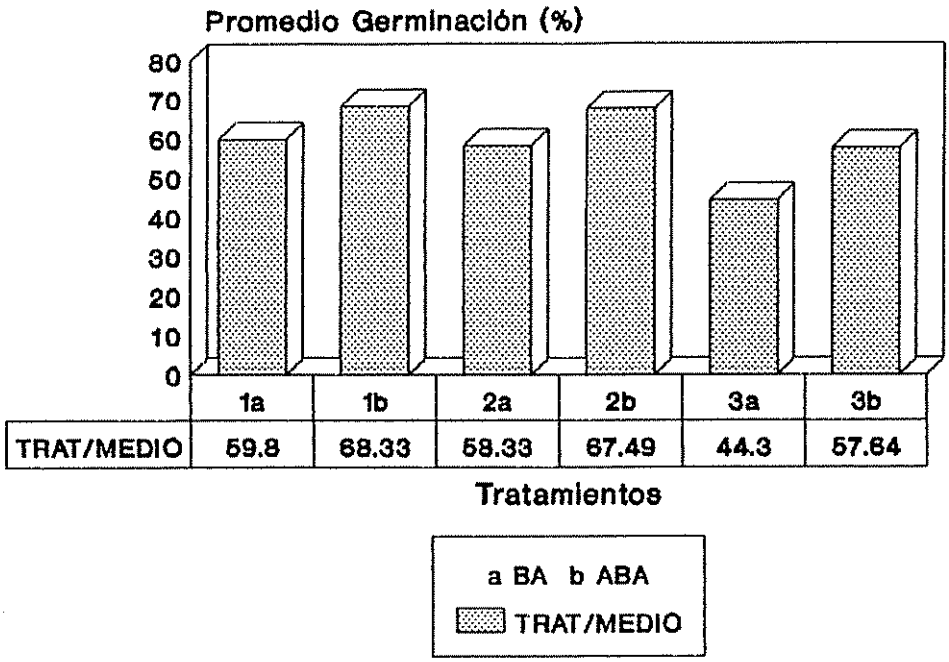


FIGURA 8. PROMEDIO DE GERMINACION POR TRATAMIENTO DE *Musa balbisiana.*

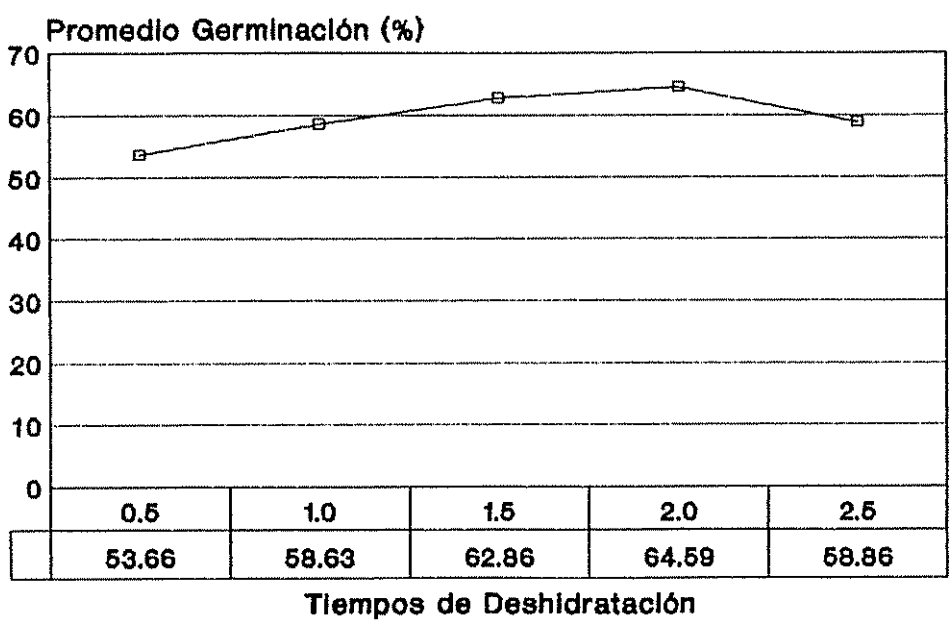


FIGURA 9. PROMEDIO DE GERMINACION POR TIEMPO DE DESHIDRATACION DE *Musa balbisiana.*

4.6. Estudio Histológico De Los Embriones Crioconservados.

El estudio histológico de los embriones consistió en conocer el estado de las células de éstos tanto a nivel de gémula como de haustorio, posterior a la crioconservación. Para ésto, fueron estudiados los cortes de cinco respuestas diferentes del embrión, transcurridos 45 días dentro de la etapa de recuperación y germinación.

4.6.1. Gran Control.

En este tipo de tejido, se pudo observar una gran división celular con mucho contenido celular a nivel de haustorio (Figura 10 y 11), en su parte central y extrema (Figura 12). Se apreció también que hay una mayor cantidad de sustancias de almacenamiento, comparada con el resto de los tratamientos (Figura 13).

4.6.2. Control Embriones Deshidratados Sin Congelamiento.

El tejido que fué sometido a este proceso presentó algunas de las células de la gémula en división, además, de tener una coloración parda. De acuerdo con Escalant y Teisson (1987), este fenómeno significa el despertar de la activación de las fenoloxidasas y es la primer manifestación de la viabilidad y de la germinación *in vitro*. También hay gran actividad mitótica, así como acumulación de sustancias de almacenamiento a nivel de haustorio (Figura 14).

Si bien, este tipo de división celular tiende más a la formación de tejido vascular, pues se ve bien desarrollado; también hay presencia de proembriones, aunque en poca cantidad (Figura 15 y 16). No hay presencia de células deterioradas por la deshidratación.

4.6.3. Embriones No Sobrevivientes.

El estudio histológico demuestra, eventos contrarios al estado en el que se había definido al embrión. Se puede apreciar alguna división celular a nivel de epidermis y de gémula, si bien éstas no están diferenciadas (Figura 17).

Así mismo, se pudo observar la presencia de algunas células deterioradas a nivel de haustorio, aunque con cierta división celular interna, pues las células están bien preservadas si bien, se puede observar que casi no hay proembriones (Figura 19). A nivel de haustorio, las células se notan turgentes, sin embargo, no hay indicios de división celular (Figura 18).

4.6.4. Embriones Sobrevivientes Sin Germinación.

En las observaciones y estudio de estos embriones a nivel histológico hay mucha división y alargamiento celular. El contenido celular del haustorio y la gémula se ven muy pardos debido a la gran liberación de fenoles y polifenoles oxidados por el explante con excepción del meristema apical del epicotilo que es bien claro que está germinando (Figura 20 y 21).

4.6.5. Embriones Sobrevivientes y Germinando.

En este tejido se encontraron células bien preservadas, gran división y alargamiento celular, predominantemente, a nivel de gémula. Los brotes se aprecian perfectamente bien desarrollados (Figura 22).

Ahora bien, a nivel de haustorio las células están bien preservadas pero no hay división y su contenido celular es diferente al resto del embrión, pues mientras éste germina, utiliza las reservas de las células y digiere las proteínas, ocacionando la coloración parduzca causada por la liberación de fenoles y polifenoles oxidados (Figura 23).

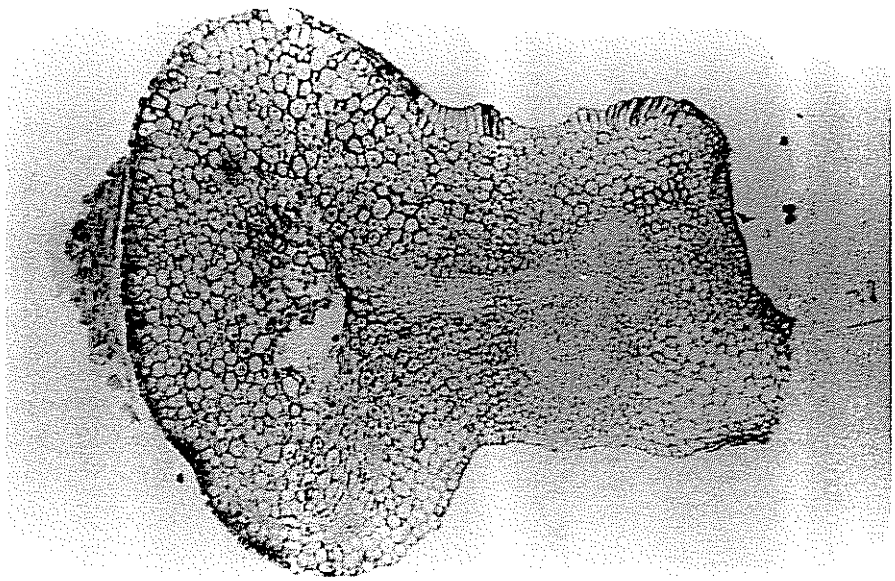


Figura 10.- Microfotografía de un corte histologico de un embrión cigótico de *Musa*, donde se observan las células del primordio radical y del meristema apical, en estado de desarrollo (4X).

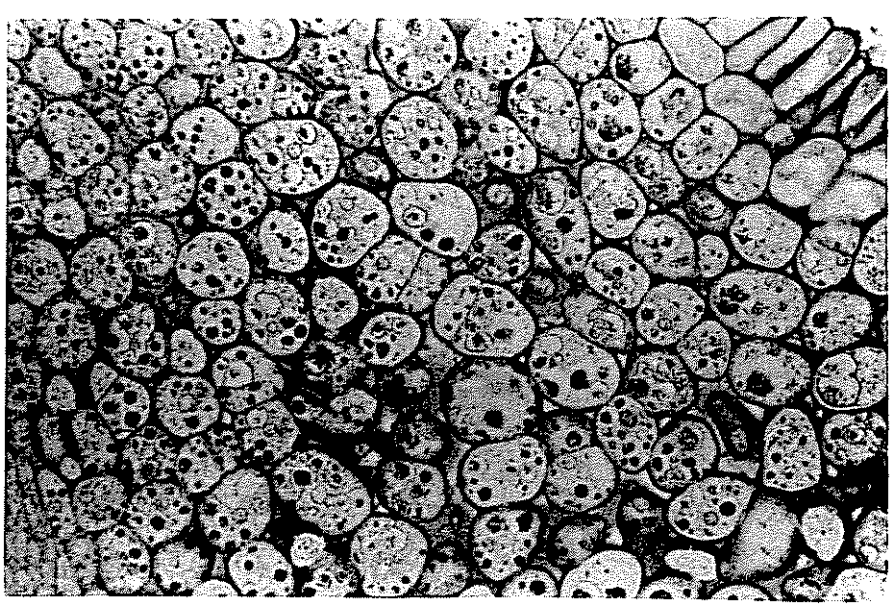


Figura 11.- Células en división a nivel de haustorio. (20X).

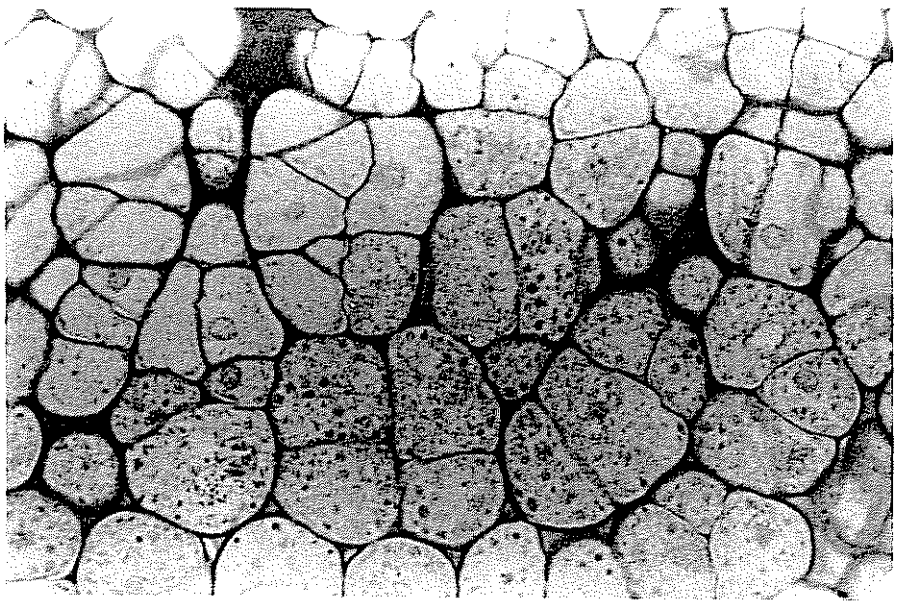


Figura 12.- Detalle de estructuras proembriónicas a nivel de haustorio donde se observa gran contenido celular (40X).

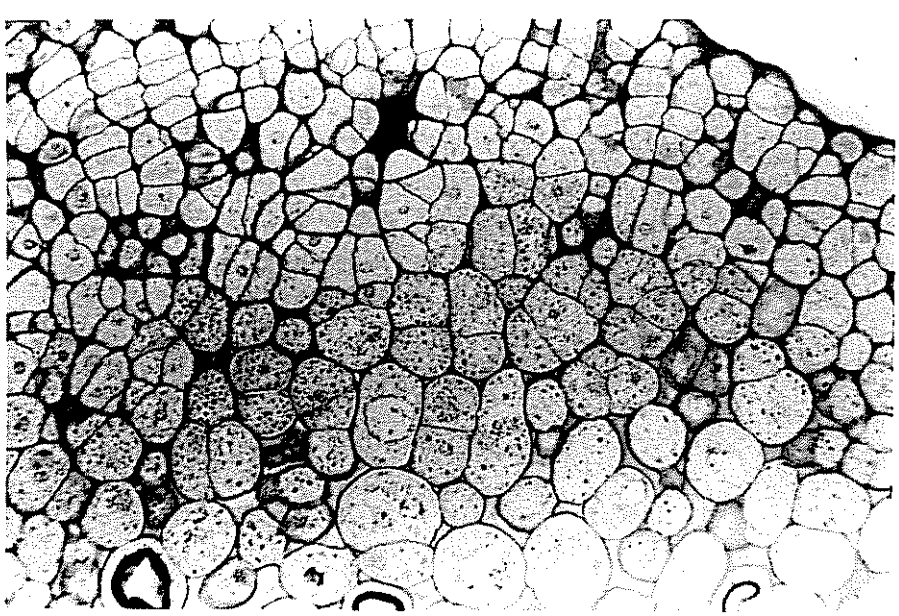


Figura 13.- Células en activa división en el haustorio y epidermis de un embrión cigótico (20X).

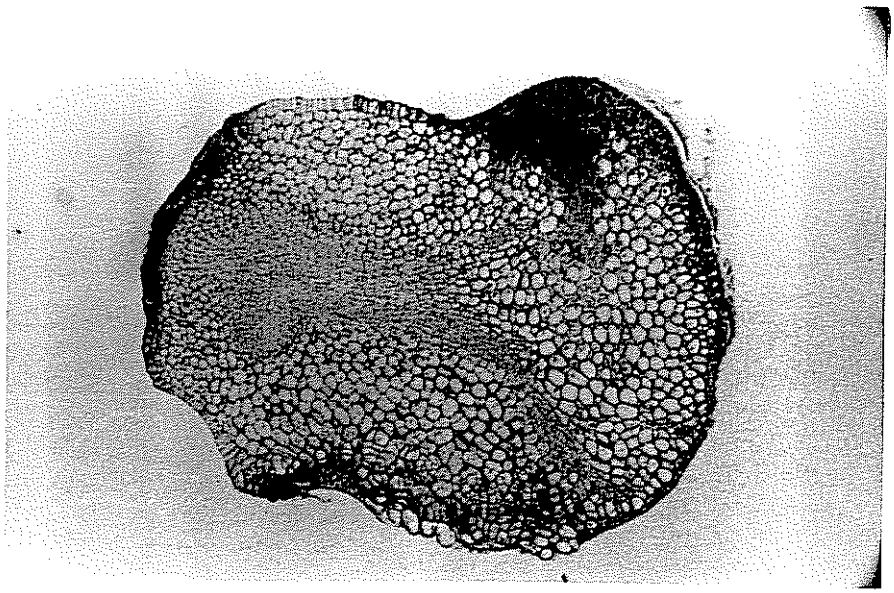


Figura 14.- Corte longitudinal de un embrión sometido a pretratamiento de deshidratación, el cual no presenta daño en las células de la gémula y el haustorio (4X).

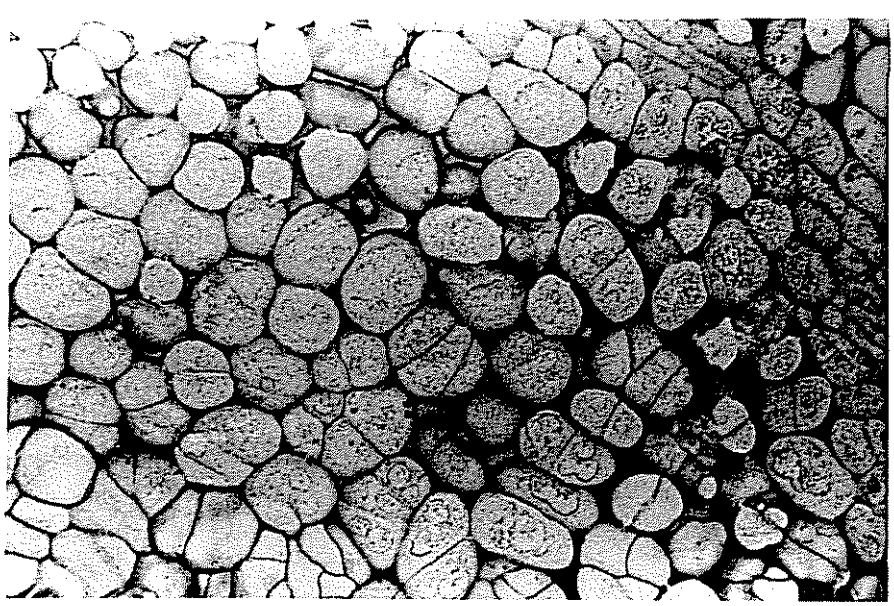


Figura 15.- Células en división a nivel de haustorio de un embrión cigótico sometido a deshidratación (20X).

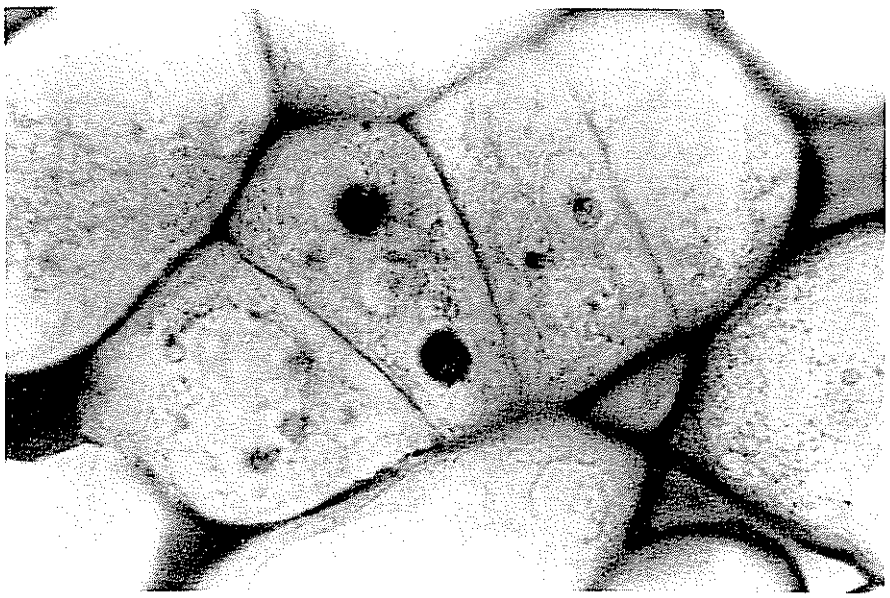


Figura 16.- Estructura proembriónica observada en el haustorio de un embrión cigótico, pretratado con deshidratación (100X).

Figura 17.- Histología de un embrión cigótico sometido a congelamiento (4X).

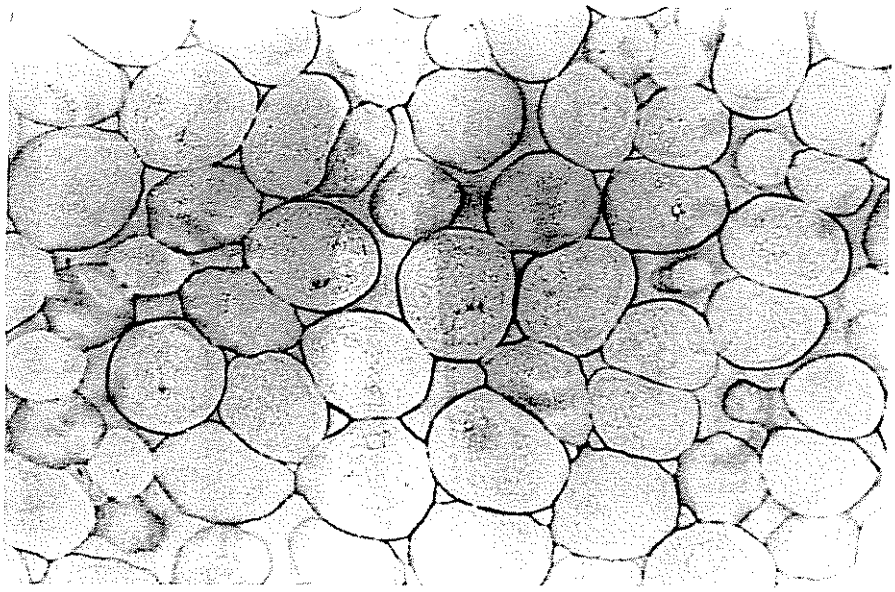


Figura 18.- Células de un embrión no sobreviviente, las cuales se notan turgentes pero en las que no hay indicio alguno de división celular (20X).

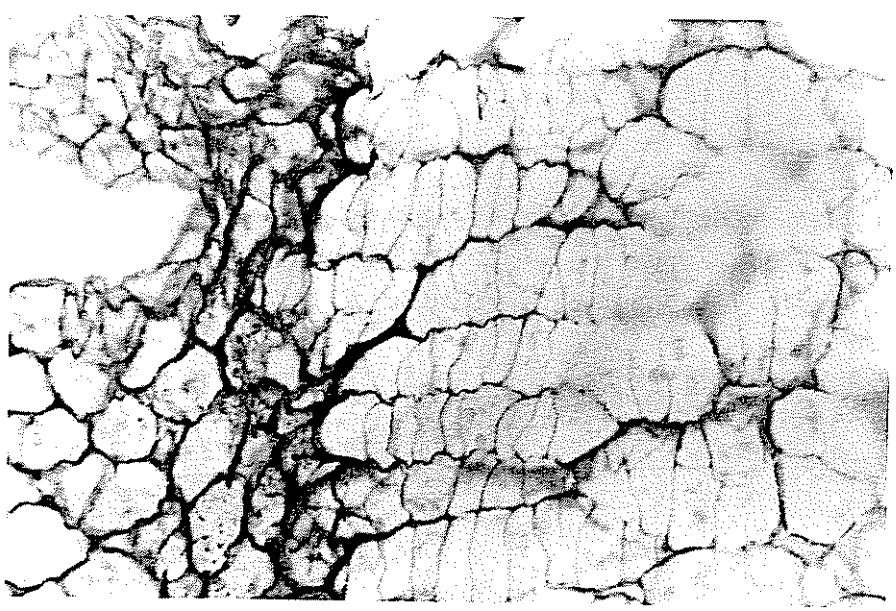


Figura 19.- Divisiones celulares periclinales en la periferia del embrión sometido a congelamiento. Obsrvese la presencia hacia el interior de células colapsadas (20X).

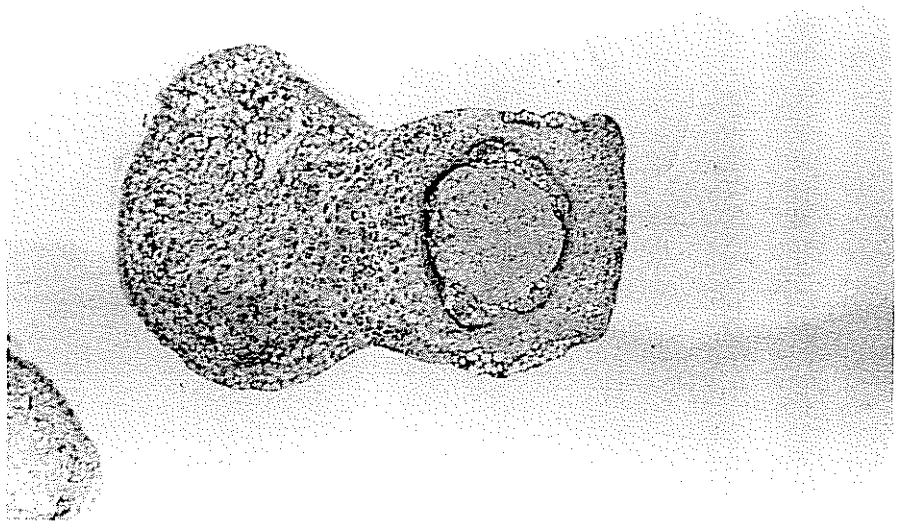


Figura 20.- Corte histológico de un embrión sobreviviente al congelamiento el cual no presentaba indicios de germinación. Obsérvese, sin embargo, el embrión en germinación con gran producción de fenoles (4X).

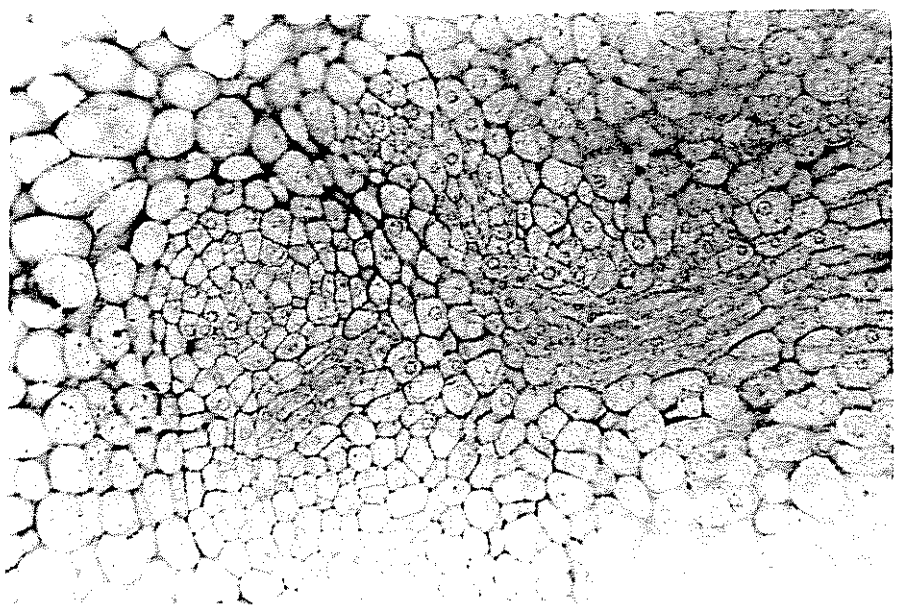


Figura 21.- Gémula de un embrión recuperado donde se distinguen las células del meristema apical (20X).

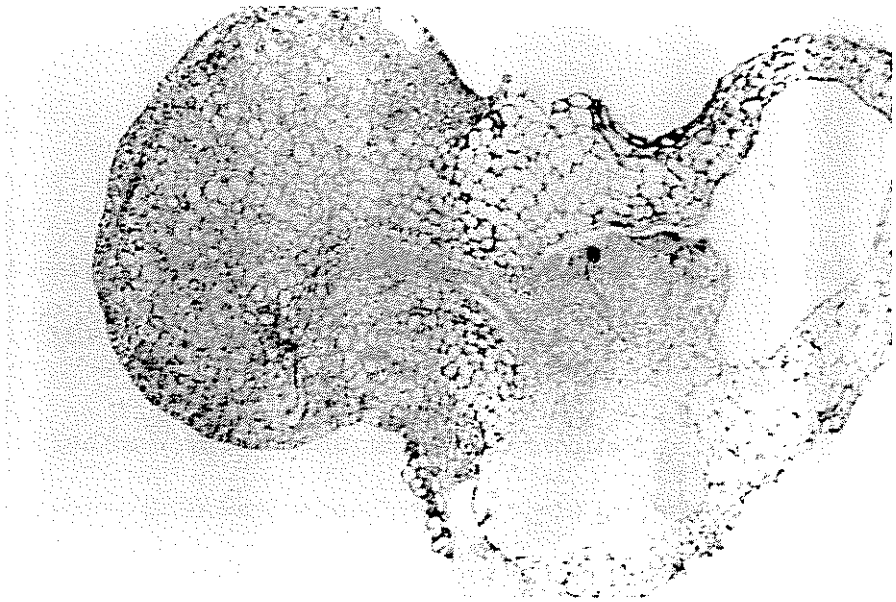


Figura 22.- Corte longitudinal de un embrión cigótico recuperado del congelamiento, el cual se encuentra germinando y con gran desarrollo radical (4X).

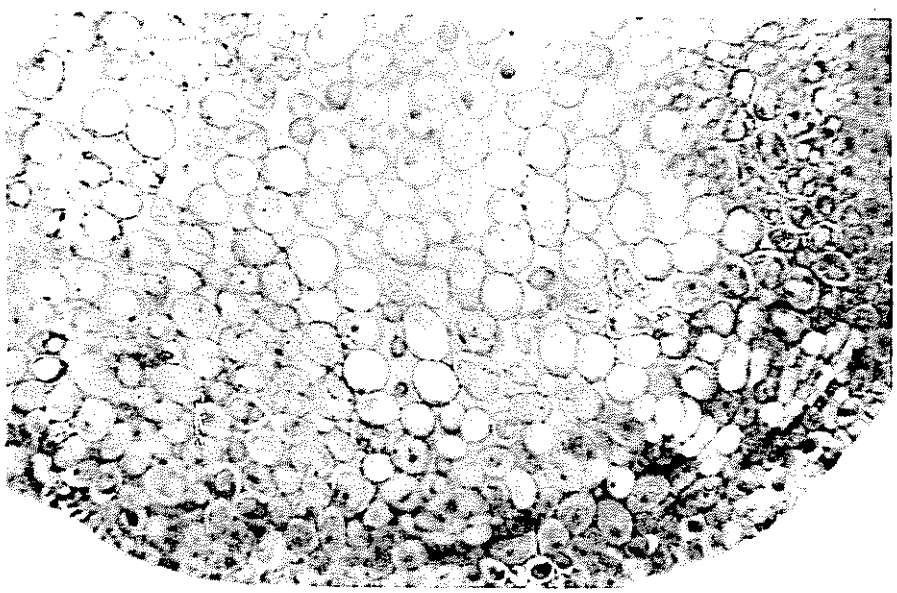


Figura 23.- Células del haustorio en división (10X).

5. D I S C U S I O N.

5.1. Determinación Del Estado De Madurez Del Embrión Cigótico Para Su Crioconservación.

Los resultados obtenidos mostraron que unicamente los embriones maduros de Musa eran capaces de reducir el 2,3,5-Trifenil tetrazolio, mientras que los embriones inmaduros no lo eran.

De acuerdo con Mouravieff (1981), a nivel de estudios de histoquímica, el TTC es utilizado para determinar la localización de los sitios de actividad enzimática. La reducción de TTC es hecha a nivel de mitocondria donde son aceptados los electrones en la región del citocromo oxidasa de la cadena de transportes de los electrones (Kalina y Palmer, 1968). Ahora bien, los embriones inmaduros de *Musa* no redujeron el 2,3,5-Trifenil tetrazolio pues el tejido no está aun completamente diferenciado y se encuentra en un estado muy bajo de metabolismo y de respiración, lo que limita el intercambio de elctrones en el proceso de reducción.

Los resultados obtenidos en el uso de los crioprotectores indican la necesidad de un pretratamiento crioprotector efectivo para lograr un alto porcentaje de recuperación del explante crioconservado. Es bien entendido, que la sacarosa es necesaria para el mantenimiento de las estructuras celulares, como sustrato del metabolismo. La sacarosa ha sido conocida por ocacionar una mejor aclimatación, Sakai y Yoshida (1968), demostraron que las hojas de gardenia (*Gardenia grandiflora*) y col (*Brassica oleracea*) a las cuales se les había introducido sacarosa, mostraron un apreciable incremento en la tolerancia al congelamiento. Similarmente, callo de cereza es conocido por mostrar un incremento en la aclimatación después de la incorporación de la sacarosa (Tumanov *et al.*, 1968).

En el presente estudio, la sacarosa que se había venido utilizando en varios protocolos de crioconservación en diferentes especies, demostró, para *Musa*, que su empleo no proporcionó ninguna protección especial en los embriones cigóticos que fueron pretratados con sacarosa. El otro crioprotector empleado, DMSO, de conocido poder crioprotector, no fué particularmente efectivo para los embriones cigóticos de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata*. La naturaleza exacta del modo de acción del DMSO y de otros compuestos crioprotectores es la de formar cadenas múltiples de hidrógeno con el agua y con los fosfolípdos de las

membranas celulares, generando una especie de cubierta, la cual proteje a las células contra la penetración de cristales de hielo formados en el medio crioprotector durante la fase de precongelamiento. Estos compuestos también ejercen efectos crioprotectores para prevenir el incremento excesivo en la concentración de electrolitos, los cuales ocurren durante el congelamiento lento (Mazur, 1984; Gazeau y Dereuddre, 1986). Sin embargo, a altas concentraciones reducen la respiración e inhiben la síntesis de ARN y proteinas en las células aisladas y tejidos vegetales (Bajaj *et al.*, 1970a). Además, la absorción del crioprotector por las células, es claramente crítico en su efectividad, como evidenció, por un lado, la toxicidad del DMSO a las 48 horas de incubación y por otro, las distintas concentraciones de sacarosa y su largo período de pretratamiento que fueron utilizados, las cuales no representaron efectos de respuesta distintos a los encontrados en embriones no pretratados con sacarosa.

Su papel no se limita, sin embargo, solo a eso, puesto que sus efectos sobre la resistencia dependen en gran parte de su concentración. El aumento en los niveles de sacarosa, sin embargo, no debe pasar de cierto umbral pues la concentración más allá de 0.75 M puede causar de acuerdo a Bajaj y Reinert, (1977), una plasmólisis y un daño considerable a las células que bien podría evitarse, tal y

como sucedió para la especie *Musa acuminata* en la que redujo su viabilidad al 50% a esta concentración.

5.2. Efecto De La Deshidratación En Precultivo Sobre La Resistencia De Los Embriones Cigóticos De *Musa*.

Los datos presentados indican que los embriones aislados de las dos especies de *Musa* en estudio son marcadamente resistentes a la deshidratación. La disminución en el contenido de humedad fué encontrado apropiado para los estudios de crioconservación, donde los embriones sobrevivieron en principio a la disminución en el contenido hídrico. Grout *et al.*, (1983), llevó a cabo un estudio similar en embriones de palma de aceite. Encontraron que los embriones deshidratados a un contenido de humedad de 10.4% permanecieron viables durante su almacenamiento en nitrógeno líquido por espacio de 8 meses sin pérdida alguna de viabilidad.

5.3. Ensayos Preliminares De Congelamiento De Embriones Cigóticos Con Crioprotectores.

El resultado más contundente observado con embriones de *Musa*, fué la posibilidad de obtener la reanudación de la proliferación, utilizando el congelamiento rápido sobre el tejido de una especie que durante varios intentos había fracasado en recuperar su viabilidad. Engelmann y Dereuddre (1988), reportaron para embriones somáticos de palma de

aceite dos tasas de enfriamiento de un rango de 0.5°C/min a 40°C/min hasta -100°C previo a la inmersión en nitrógeno líquido y a una tasa de 200°C/min en el caso de congelamiento rápido; no obstante, se obtuvo una recuperación más baja en las tasas de enfriamiento lento (0.5 ó 1.0°C/min) que para las tasas de enfriamiento rápido. Se podría decir que el congelamiento rápido induce la formación intracelular de microcristales de hielo no letales.

Los resultados obtenidos con los embriones cigóticos de *Musa* cualquiera que sea la tasa de enfriamiento, podría ser debido al hecho que ellos toleran bien la deshidratación parcial pronunciada y que junto con la deshidratación previa con flujo de aire estéril, proporciona una condición en la que el embrión sea protegido y así evitar formación de cristales que puedan dañar las estructuras celulares.

5.4. Efecto De Los Tratamientos En La Recuperación Del Embrión Cigótico De *Musa balbisiana* Posterior Al Descongelamiento.

La resistencia de los embriones cigóticos de *Musa* al nitrógeno líquido, depende de las tasas de deshidratación dentro de los diferentes pretratamientos. Pritchard y Prendergast (1986), sometieron a una deshidratación de hasta el 20% de humedad relativa usando un flujo de aire estéril,

a embriones cigóticos de *Araucaria hunstenii* Schumm. Estos embriones, aislados asépticamente mostraron una sobrevivencia de hasta el 80% después del congelamiento. Por otra parte, Chin *et al.*, (1988), encontraron que embriones cigóticos aislados de semilla de palma de *Veitchia* y *Howea*, podían ser recuperados exitosamente del congelamiento, tras haber sido deshidratados a un contenido de humedad de alrededor del 10% y donde la planta presentó un desarrollo normal en cultivo.

En el presente trabajo, a partir de los resultados obtenidos para *Musa balbisiana*, se puede afirmar que en los diferentes tiempos de deshidratación, el embrión presentó hasta un 80 % de viabilidad en su recuperación posterior al congelamiento.

Ahora bien, en los tratamientos 2 y 3, donde se utilizaron altas concentraciones de sacarosa, se esperaba que su posición en el proceso de crioconservación definiría la capacidad del explante a recuperarse, además de que el papel de la sacarosa en ambos tratamientos sería distinto; ocurrió que en el tratamiento 3, la sacarosa fué utilizada como pretratamiento para inducir la deshidratación del explante, y en el tratamiento 2, en que las altas concentraciones fueron utilizadas posterior al descongelamiento, la sacarosa evidentemente funcionaría como un catalizador para inducir al embrión a una mejor

recuperación. Sin embargo, no se presentó diferencia de respuesta estadística entre los tres tratamientos.

Pritchard *et al.* (1986a), reportaron que las células de soya y sycamore no mostraban una contracción en su volumen cuando fueron cultivados bajo condiciones de stress osmótico. En contraste, los resultados que presentó Pritchard *et al.* (1986), muestran que las células de sycamore tienen la habilidad de contraer tanto su protoplasto como su pared celular cuando son expuestos a una solución crioprotectora hipertónica (2 M).

Los reultados indican que el precrecimiento confiere, probablemente, mayor tolerancia al congelamiento como resultado de una adaptación de las células en respuesta al medio de stress osmótico. Aparentemente, sin embargo, la habilidad de las células a adaptarse puede variar entre especies. Por ejemplo, las células de soya mostraron un ajuste osmótico que incrementó su sobrevivencia al exponerlas a un crioprotector de alta molaridad (Pritchard *et al.*, 1986b). En contraste, las células de sycamore muestran el mayor ajuste osmótico (4 veces) al mismo estrés osmótico (Pritchard *et al.*, 1986b). Lo anterior puede evidenciar claramente las diferentes respuestas entre las especies *M. acuminata* y *M. balbisiana* a la misma presión osmótica. Además, es bien conocido que el genoma BB es menos suceptible a los cambios de las condiciones del medio.

La tabla de análisis de varianza para la sobrevivencia de los embriones de *Musa* dentro de los tres tratamientos, muestra valores de "F" no significativos y da una evidencia clara de que los tratamientos proporcionaron resultados muy similares, no existiendo diferencias tales que indiquen que algún tratamiento pueda incrementar o disminuir la resistencia y recuperación de los embriones al congelamiento. Es decir, el empleo de la sacarosa como crioprotector y como posible catalizador de la recuperación y germinación no tuvo efecto alguno por lo que se puede asegurar que la deshidratación del embrión es suficiente para tener una recuperación exitosa del congelamiento. Pritchard y Prendergast (1986), obtuvieron el 80 % de sobrevivencia de los embriones aislados asepticamente y los que fueron sometidos a una deshidratación rápida hasta un 20 % del contenido de humedad seguido del congelamiento. Así mismo, Chin *et al.* (1988), obtuvieron hasta un 70 % de sobrevivencia de los embriones de palma *Veitchia* y *Howea* sometidos a deshidratación con flujo de aire estéril a un contenido de humedad del 10 %. Por otra parte, Al-Madeni y Tisserat (1986), han mostrado que la semilla completa de palma de datil (*Phoenix dactylifera* var. Zahidi), deshidratadas a un contenido de humedad de 7.8 %, pudieron sobrevivir satisfactoriamente a la crioconservación por 1 año y medio sin pérdida de su viabilidad. Grout *et al.* (1983), en su estudio en la crioconservación de semillas completas de palma de aceite las que fueron deshidratadas a

un contenido de humedad del 4.4 % de su peso fresco, reportaron una pérdida total en la viabilidad de las semillas. Leonhart *et al.* (1984), en su ensayo, también con semillas de palma de aceite, reportaron que las semillas deshidratadas a un contenido de humedad de 9.1 %, pueden sobrevivir a un alamcenamiento breve en nitrógeno líquido y germinar normalmente.

Por otra parte, si consideramos lo anterior para cada uno de los tiempos de deshidratación, solo hubo una pequeña diferencia en cuanto al efecto que causaron los tiempos de deshidratación en la sobrevivencia de los embriones una vez descongelados.

La prueba de "Duncan" de los tiempos de deshidratación con respecto a la sobrevivencia, muestra dos diferencias significativas básicas que son los extremos, es decir, el tiempo de deshidratación ideal (2 horas) en el que se obtuvo 70% de sobrevivencia; y el tiempo de deshidratación que aportó una tasa de sobrevivencia mínima (0.5 horas). El tiempo de deshidratación 2.5 horas, si bien, no presenta diferencia estadística de sobrevivencia, sí se puede apuntar que sus valores disminuyen considerablemente, por lo que es posible asegurar que el pretratamiento 2 horas de deshidratación, es el tiempo más adecuado para que los embriones tengan un porcentaje de sobrevivencia aún mayor, más allá de este tiempo, el embrión sufrirá daños que

reduciran su capacidad de recuperación puediendo afectar el desarrollo de alguna de sus estructuras tal como lo reporta Chin *et al.* (1988), para embriones de palma Veitchia y Howea que fueron dehidratados hasta un contenido de humedad del 10 % y más tarde crioconservados, en los que se encontró una ausencia en el desarrollo del haustorio el cual es vital para la absorción y transporte de nutrientes desde el endospermo hacia el desarrollo del embrión además, es altamente metabólico y posee un número diverso de enzimas.

De acuerdo a experimentos recientes, Abdelnour, (comunicación personal, 1990), encontró que para embriones de *Musa balbisiana* a partir de la primera media hora de deshidratación, el contenido de humedad disminuye de un 73 % a un 26 % y al transcurrir del tiempo y llegar a 2 horas de deshidratación, que fué el tiempo que arrojó las tasas de sobrevivencia más altas; este contenido de humedad disminuye de forma más paulatina llegando hasta un 8 %. Es por ello que en los resultados obtenidos, se observa que existe diferencia cuantitativa importante en los porcentajes de recuperación, lo que indica que realmente sí existe variación en las respuestas de congelamiento a los diferentes grados de deshidratación, tan importante, que ocaciona la gran diferencia entre los porcentajes de recuperación de el tiempo 0.5 horas, con un contenido de humedad de 26 % y 2.0 horas, con un contenido de humedad del 8 % +/- 0.5.

5.5. Efecto De Los Tratamientos En La Recuperación Del Embrión Cigótico De *Musa acuminata* Posteriro Al Descongelamiento.

Los resultados en las respuestas de recuperación de los embriones de *Musa acuminata*, tuvieron dos diferencias básicas de acuerdo a lo reportado por la prueba de "Duncan", siendo el tratamiento 1 el que mejor respuesta proporcionó y donde los niveles de recuperación en los tratamientos 2 y 3, debido a la inclusión de las concentraciones de sacarosa, se vieron afectados considerablemente como se observó en los ensayos preliminares.

Originalmente, se especuló en la posibilidad de que congelar los embriones con un pretratamiento de sacarosa incrementaría la resistencia del explante. Sin embargo, es evidente que el daño y la inhibición de la viabilidad fué ocacionada en la etapa de pretratamiento y recuperación y no en la fase de congelamiento, debido a que las concentraciones elevadas de sacarosa crearon un medio de gran presión osmótica intracelular y de acuerdo con Bajaj et al. (1970a), llegando a reducir la respiración e inhibir la síntesis de ARN y proteínas en las células del tejido.

Así pues, es nuevamente el tratamiento 1, en el que unicamente se emplearon tiempos de deshidratación, el que con toda seguridad proporciona la mejor tasa de recuperación.

Por otra parte, a diferencia de *Musa balbisiana, Musa acuminata* presentó gran suceptibilidad al pretratamiento de deshidratación, encontrándose el porcentaje ideal de recuperación posterior al congelamiento, en los tiempos 2.0 y 1.5 horas. Así mismo, de acuerdo a lo encontrado por Abdelnour, (comunicación personal, 1990), realmente se puede suponer de antemano que el contenido de humedad disminuye proporcionalmente al tiempo de exposición al flujo de aire estéril, donde los tiempos críticos de deshidratación son exactamente los extremos, es decir, a 0.5 horas, no ha sido suficiente para asegurar la deshidratación y la no formación intracelular de cristales de hielo letales, y a 2.5 horas, la deshidratación, aunado al congelamiento, lograron inhibir la capacidad de recuperación de las células del explante.

5.6. Efecto De Los Tratamientos Sobre La Germinación De Los Embriones Cigóticos De *Musa balbisiana*.

La prueba de "Duncan" para la germinación de los embriones de *Musa balbisiana* dentro de los 3 tratamientos y 2 medios de germinación, indicó que los medios no fueron estadisticamente significativos. Sin embargo, a nivel de respuesta cuantitativa, sí hay diferencia, con valores superiores de germinación en el tratamiento 1 y 2 que fueron recuperados y puestos a germinar en medio que contenía ABA. Notese que son estos tratamientos, precisamente, en los que las concentraciones de sacarosa no se utilizaron como pretratamiento, los que tuvieron mejor respuesta de germinación. De aquí que se considere que el pretratamiento con sacarosa además de ser innecesario, crea una situación de gran presión osmótica al excederse los niveles de deshidratación intracelular.

La gran variabilidad en las respuestas de germinación para *Musa acuminata*, son respuesta clara del deterioro causado, primero, por las elevadas concentraciones de sacarosa, segundo, por los diversos tiempos de deshidratación y su combinación con sacarosa y, tercero, por su gran suceptibilidad a la manipulación a través del proceso de crioconservación.

6. C O N C L U S I O N E S.

1.- No hubo diferencia en los niveles de sobrevivencia de *Musa balbisiana*, en ninguno de los tres tratamientos.

2.- Las tasas más altas de recuperación para *Musa acuminata* fueron obtenidas en el tratamiento 1.

3.- El contenido ideal de humedad relativa para la crioconservación y subsecuente recuperación fué logrado a las 2.0 horas de deshidratación en cámara de flujo laminar.

4.- Las altas concentraciones de sacarosa ocacionaron un aumento en la presión osmótica del embrión, lo suficientemente alta para impedir su recuperación.

5.- La combinación de deshidratación natural, congelamiento rápido y descongelamiento rápido, fué el protocolo de crioconservación más efectivo para los embriones cigóticos de *Musa*.

6.- La deshidratación aunada al congelamiento rápido, que ayuda a las células a una deshidratación progresiva aún mayor, proporcionó las bases para la no formación de cristales de hielo intracelulares.

7.- El medio que contenia 1 mg/l de ABA, fué el mejor en la obtención de un mayor porcentaje de germinación dada su alta capacidad de inducción de la embriogénesis.

8.- La germinación del explante está en función básicamente del medio de recuperación.

9.- El estudio de la crioconservación de diploides de *Musa* y su subsecuente germinación, forma las bases para investigaciones más detalladas rumbo al almacenamiento a largo plazo de este importante germoplasma por métodos criogénicos, asegurando un material estable y libre de enfermedades.

7. RECOMENDACIONES.

1.- Desarrollar otras técnicas para determinar la viabilidad inmediata de los embriones inmaduros y así tener otra posibilidad para la crioconservación de diploides.

2.- Realizar un estudio histológico exhaustivo del embrión que sobrevive y germina y el que no lo hace, para determinar el estado de madurez real del embrión en el cual, se puede asegurar una tasa alta de recuperación.

3.- Determinar el contenido de humedad relativa mínima requerida para la crioconservación del explante y su recuperación futura.

4.- Efectuar estudios y pruebas de viabilidad a tiempos superiores de almacenamiento de los embriones, en nitrógeno líquido.

5.- El DMSO debería ser incluido en otro programa y hacer su aplicación a temperaturas bajas a una tasa apropiada, a un tiempo apropiado, ya sea con embriones o con otro tipo de explante.

6.- Efectuar el mismo proceso de tratamientos y pretratamientos a distintas tasas de disminución de temperatura.

7.- Realizar pruebas en lo concerniente al medio de recuperación del explante.

8. B I B L I O G R A F I A.

AL-MADENI, M.A. Y TISSERAT, B. 1986. Seed Sci. & Technol. 14:79-85.

BAJAJ, Y.P.S. 1979. Establishment of germplasm banks through freeze-storage of plant tissue culture and their implications in agriculture. In Plant cell and tissue culture: Principles and applications. Ed. by W.M.Sharp. Columbus; Ohio University Press. p. 745-774.

BAJAJ, Y.P.S. 1981. Regeneration of shoot from ultralow frozen anthers of *Primula abronica*. Scientia Horticulturae 14:93-95.

BAJAJ, Y.P.S. 1983. Cryopreservation and international exchange of germplasm. In Plant cell culture in crop improvement. Ed. by S.K. Sen y K. Giles. New York; Plenum Press. p. 19-41.

BAJAJ, Y.P.S. AND REINERT, J. 1977. Cryobiology of plant cell cultures and stablishment of gene banks. In Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Ed. by J. Reinert y Y.P.S. Bajaj. Berlin; Springer Verlag. p. 757-777.

BAJAJ, Y.P.S.; RATHORE, V.S.; WITTWER, S.H. Y ADAMS, M.W. 1970a. Effect of dimethyl sulfoxide on zinc^{65} uptake respiration and RNA and protein metabolism in bean (*Phaseolus vulgaris*) tissues. Am. J. Botany 57:794-799.

BAKRY, F. Y ROSSIGNOL, L. 1985. Analyse des capacites de callogenese et d'organogenese obtenues a partir de differents tissus de Bananiers (*Musa sp.*, *Musacees*). Fruits, 40:697-708.

BANERJEE, N. Y DE LANGHE E. 1985 A tissue culture method for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions for Musa (banana and plantain). Plant Cell Reports 4:351-354.

BASS, L.N. 1983. Germplasm preservation. In Conservation of crop germplasm-an international perspective. Ed. by W.L. Brown, T.T. Chang, M.M. Goodman, Q. Jones. Madison, Crop Science Society of America. p. 55-65.

BERG, L.A. Y BUSTAMANTE, M. 1974. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. Phytopathology 64:320-322.

BLANCO, A. 1985. El problema de germoplasma en el mundo. In El cultivo de tejidos vegetales en México. Ed. by M. Robert y V.M. Loyola. México; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. p. 27-34.

CHARNE, D.G.; PUKACKI, P.; KOTT, L.S. Y BEVERSDORF, W.D. 1988. Embryogenesis following cryopreservation in isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.). Plant Cell Reports 7:407-409.

CHIN, H.F.; KRISHNAPILLAY, B. Y ALANG, Z.C. 1988. Cryopreservation of *Veitchia* and *Howea* palm embryos: Non-development of the haustorium. Cryo-Letters 9:372-379.

CHIUNG-CHIKUO Y LINEBERGER, D. Survival of *in vitro* cultured tissue of "Jonathan" apples exposed to -196° C. Hortscience 20(4):764-767.

CRONAUER, S. Y KRIKORIAN, A.D. 1984 Rapid multiplication of bananas and plantains by in vitro shoot tip culture. HortScience 9:325-328.

CRONAUER, S. Y KRIKORIAN, A.D. 1984c. Somatic embryos from cultivated tissues of triploid plantains (*Musa* "ABB"). Plant Cell Reports. 2:289-291.

CRONAUER, S.S. Y KRIKORIAN, A.D. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. Plant Cell Reports 7:23-25.

DE GUZMAN, E.V.; DECENA, A.C. Y UBALDE, E.M. 1980. Plantlet regeneration from unirradiated banana shoot tip tissues cultures in vitro. Philippine Agriculturist 63:140-146.

DEREUDDRE, J. Y ENGELMAN, F., s.f. The use of cryopreservation for setting up banks of plant germplasm. 31 p.

DEREUDDRE, J.; FABRE, J. Y BASSAGLIA, C. 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot-tips excised from different aged *in vitro* plantlets. Plant Cell Reports 7:170-173.

DIETTRICH, B.; WOLF, T.; BORMANN, A.; POPOV, A.S.; BUTENKO, R.G. Y LUCKNER, M. 1987. Cryopreservation of *Digitalis lanata* shoot tips. Planta Medica, Journal of Medicinal Plant Research (57)4:311-394.

DORESWAMY R.; SRINIVASA RAO,N.K. Y CHACKO, E.K. 1983. Tissue-culture propagation of banana. Scientia Horticulturae 18:247-252.

ENGELMANN, F.,DUVAL,Y. Y DEREUDDRE, J. 1985. Survival and proliferation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos after freezing in liquid nitrogen. C.R. Acad. Sc. Paris (serie III), 301(3):111-116.

ESCALANT, J.V. Y TEISSON, C. 1987. Comportements *in vitro* de l'embrion isolé du bananier (*Musa* species). Fruits. 42(6):333-342.

ESCALANT, J.V. Y TEISSON, C. 1988. Embryogenèse somatique chez *Musa* sp. C.R. Acad. Sci. Paris, t. 306, serie III, p. 277-281.

ESCALANT, J.V. Y TEISSON, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Reports 7:665-668.

ESPINOSA, N., ESTRADA, R., TOVAR,P., BRYAN,J. Y DODDS, J.H. 1985. Cultivo de tejidos: Micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Lima, Centro Internacional de la Papa (Documento de Tecnología Especializada 1). 17 p.

ESQUINAS, A.J. 1981. Los recursos fitogenéticos una inversión segura para el futuro. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos; Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, 44 p.

FORD-LLOYD, B. Y JACKSON, M. 1986. Plant genetic resources: an introduction to their conservation and use. Edward Arnold Ltd., London.

GEORGE, E.F. Y SHERRINGTON, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley, G.B. Exegetics. 709 p

GROUT, B.W. 1980. Cold hardening and cryoprotection, recovery and stored material. In Crop genetic resources: The conservation of difficult material. (Proceedings). Ed. by L.A. Withers y J.T. Williams.

GROUT, B.W.W.; SHELTON, K. AND PRITCHARD, H.W. 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genentic conservation. Annals of Botany 52(3):381-384.

GULICK, P. Y VAN SLOTEN, D.H. 1984. Directory of germplasm collections; 6.I. Tropical and subtropical fruits and tree nuts. International Board for Plant Geneic Resources. AGPG:IBPGR/84/85. 191 P.

HASKINS, R.H. Y KARTHA, K.K. Freeze preservation of pea meristems: cell survival. Canadian Journal of Botany 58(8):833-840.

HAUPTMANN, R.M. Y WIDHOLM, J.M. 1982. Plant Physiol. 70:30-34.

HENSHAW, G.G. 1975. Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. In Crop genetic resources for today and tomorrow. Ed. by H. Frankel y J.A. Hawkes. Cambridge, Cambridge University Press. p. 349-358.

HENSHAW, G.G. 1982. Tissue culture methods and germplasm storage. Proc 5th. Intl.. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Plant Tissue Culture.

HENSHAW, G.G., STAMP, J.A. Y WESTCOTT, R.J. 1980. Tissue culture and germplasm storage. In Plant cell cultures: Results and perspectives. Ed. by F. Sala; B. Parissi; O. Ciferri. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press.

IBPGR. 1986. IBPGR Advisory comitee on in vitro storage: report of the third meeting. International Board for plant Genetic Resources, Rome. 33 p.

JARRET, R. 1986. *In vitro* propagation and genetic conservation of banana and plantains. In International Board for plant genetic resources, Report of the third meeting. Rome; IBPGR. p. 15-33.

JARRET, R.L. (Ed.). 1990. Identification of genetic diversity in the genus Musa: Proceedings of an international workshop held at Los Baños, Philippines, 5-10 September 1988, 211 p.

JARRET, R.L.; RODRIGUEZ, W. Y FERNANDEZ, R. 1985. Evaluation tissue culture and propagation and dissemination of "Saba" and "Pelipita" plantains in Costa Rica. Scientia Horticulturae 25:137-147.

KALINA, M. Y PALMER, J.M. 1968. The reduction of tetrazolium salts by plant mitochondria. Histochemie 14:366-374.

KARTHA, K.K. 1981. Meristem culture and cryopreservation; Methods and applications. In Plant tissue culture; Methods and applications in agriculture. Ed. by T.A. Thorpe. Academic Press. p. 181-211.

KARTHA, K.K. 1982. Cryopreservation of plant meristems and cells. In Plant tissue culture methods. Ed. by L.R. Wetter y F. Constabel. Saskatoon; National Research Council of Canada Praire Regional Laboratory. p. 25-33.

KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L. Y PAHL, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105(4):481-484.

KUMU, Y.; HARADA, T. Y YAKAWA, T. Development of a whole plant from a shoot tip from *Asparagus officinalis* L. frozen down to -196° C. Repr. from The Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido Univ. 6(3):285-294.

LANGIS, R.; SCHNABEL, B.; EARLE, E.D. Y STEPONKUS, P.L. 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. Cryo-Letters 10:421-428.

LEONHART, K.W.; STANWOOD, P.C. Y TANIGUCHI K.T. 1984. In Proceedings of second fertilizer & ornamentals short course. The westin hikai, Honolulu University of Hawaii.

LOPEZ, J.A. 1976. Los nemátodos parásitos del cultivo del banano, su ecología y control. In Banano y plátano: enfermedades y plagas. Medellín, Colombia, AUGURA. 68 p.

Mc GAHAN, M.W. 1961. Studies of the seed of banana; I. Anatomy of the seed and embryo of *Musa balbisiana*. American Journal of Botany 48(3):230-238.

MORA, M.I. 1987. Uso de osmorreguladores e inhibidores químicos para la conservación de germoplasma *in vitro* de *Musa sp.* Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE.

MOURAVIEFF, I. 1981. Reduction *in vitro* du Nitro bleu de tétrazolium par les cellules des épidermis détrachés. Effets d'une longue privation à l'obscurité. Ann. Sci. Nat. (Paris), Serie 13, tomo 2 3:93-97.

MÜLLER, L. Y SANDOVAL, J. 1986. *In vitro* germplasm conservation of *Musa spp.* In Abstracts VI International Congress of plant tissue and cell culture. Minneapolis; University of Minnesota. 426 p.

NAG, K.K. AND STREET, H.E. 1975. Freeze preservation of cultured plant cells; I. The pretreatment phase. Physiol. Plant. 34:254-260.

NAG, K.K. AND STREET, H.E. 1975. Freeze preservation of cultured plant cells; II. The freezing and thawing phases. Physiol. Plant. 34:261-265.

NITZCHE, W. 1983. Germplasm preservation. In Handbook of plant cell culture. Vol.1. Techniques for propagation and breeding. Ed. by D.A. Evans; W.R. Sharp; P.V. Ammirato; Y. Yamada. Macmillan Publishing Co.

NUÑEZ, P.C. 1987. Determinación de la temperatura de cero crecimiento en *Musa spp.* bajo condiciones in vitro y su importancia en la conservación de germoplasma. Tesis Lic. Agron. Turrialba, C. R. Universidad de Costa Rica. 85 p.

PANIS, B.J.; WITHERS, L.A. Y DE LANGHE, E.A.L. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. Cryo-Letters 11:337-350.

PERSLEY, G.J. Y DE LANGHE, E.A. 1987. Banana and plantain breeding strategies: proceedings of an international workshop held at Cairns, Australia, 13-17 October, 1986. ACIAR Proceedings No. 21, 187 p.

PRITCHARD, H.W. Y PRENDERGAST, F.G. 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of embryos of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* Schum. Journal of Experimental Botany 37(182):1388-1397.

PRITCHARD, H.W.; GROUT, B.W.W. AND SHORT, K.C. 1986. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation; 1. Growth and ultrastructure of sycamore and soybean cell suspensions. Annals of Botany 57:41-48.

PRITCHARD, H.W.; GROUT, B.W.W. AND SHORT, K.C. 1986. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation; 2. Water relations and metabolic state of sycamore and soybean cell suspensions. Annals of Botany 57:371-378.

PRITCHARD, H.W.; GROUT, B.W.W. AND SHORT, K.C. 1986. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation; 3. Cryobiology of sycamore and soybean cell suspensions. Annals of Botany 57:379-387.

PROGRAMA DE RECURSOS GENETICOS CATIE/GTZ. 1979. Los recursos genéticos de las plantas cultivadas de América Central. Costa Rica. 30 p.

REED, B.M. 1988. Cold acclimatation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. Cryo-Letters 9:166-171.

REED, B.M. 1989. The effect of cold hardening and cool rate on the survival of apical meristems of *vaccinium* species frozen in liquid nitrogen. Cryo-Letters 10:315-322.

REED, B.M. Y LAGERSTEAD, H.B. 1987. Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen. HortScience 22(2):302-303.

REED, S.M. 1989. *In vitro* conservation of germplasm. In Scientific management of germplasm: characterization, evaluation and enhacement. Ed. by H.T. STALKER; C. CHAPMAN. IBPGR, Training courses, (Lecture series 2). Rome. p 23-30.

ROCA, W. 1983. El cultivo de tejidos vegetales para la conservación y el intercambio internacional sobre métodos de cultivo de tejidos vegetales y sus aplicaciones en agricultura. Argentina; ICRO/Universidad de Tucumán. 45 p. (mimeografiado).

ROSERO, A. Y JURADO, R. 1978. Mosaico del banano (Cucumber Mosaico Virus - C.M.V.) detectado en plantaciones de banano (Cavendish) en la zona de Urabá. In Banano y plátano: enfermedades y plagas. Medellín, Colombia, AUGURA. 68 p.

ROSERO, A. Y MUNERA, G. 1977. Enfermedad del Moko; Pudrición bacterial (I*Pseudomonas solanacearum*). In Banano y plátano: enfermedades y plagas. Medellín, Colombia, AUGURA. 68 p.

ROSERO, R.R. 1987. Banano y plátano: enfermedades y plagas. Medellín, Colombia, AUGURA. 68 p.

ROWE, P. 1985. Fitomejoramiento de banannos y plátanos. Trad. de Vielka Chang-Yan. Panamá, UPUB. 19 p.

RUBLUO, A. 1985. Estrategias para la conservación del germoplasma vegetal *in vitro*. In El cultivo de tejidos vegetales en México. Ed. by M. Roberts y V.M. Loyola. México; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. p. 35-53.

SAKAI, A. 1966. Survival of plant tissue at super-low temperatures; IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming. Plant. Physiol. 41:1050-1054.

SAKAI, A. AND OTSUKA, K. 1967. Survival of plant tissue at super-low temperatures; V. An electron microscope study of ice in cortical cells cooled rapidly. Plant. Physiol. 42:1680-1694.

SAKAI, A. AND YOSHIDA, S. 1967. Survival of plant tissue at super-low temperature; VI. Effects of cooling and rewarming rates on survival. Plant. Physiol. 42:1695-1701.

SAKAI, A. Y YOSHIDA, S. 1968. The role of sugar and related components in varation of freezing resistance. Criobiology 5:160-175.

SAKAI, A.; YAMAKAWA, M.; SAKATA, D.; HARADA, T. Y YAKUWA, T. 1978. Development of a whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196° C. Low. Temp. Sci. (Ser. B3) p. 31-38.

SANDOVAL, J. Y MÜLLER, L. 1989. Consideraciones sobre la conservación *in vitro* de musaceas; posibilidades y limitaciones. Revista de la Asociación Bananera Nacional (ASBANA) 13 (31):21-24.

SANDOVAL, J.A. 1989. Estudio de la anatomía y morfología vegetativas de plantas de Musa *in vitro*, en condiciones de aclimatación y en el campo. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 178 p.

SANNASGALA, X. 1989. Ph. D. Thesis, Universidad Católica de Leuven, Bélgica.

SCOWCROFT, W.R. 1984. Genetic variability in tissue culture: Impact on germplasm conservation and utilization. A technical report, Rome; IBPGR.

SIMMONDS, N.W. 1948. Genetic and citological studies of *Musa* X.; stomatal size and plant vigour in relation to polyplidy. Journal of Genetics. (India) 49:57-58.

SIMMONDS, N.W. 1962. The evolution of the bananas. John Wiley & Sons, Inc. New York. 170 p.

SIMMONDS, N.W. 1979. In IBPGR: Seedtechnology for genebanks. International Board for Plant Genetic Resources, Roma. pp. 1-11.

SOTO, M. 1990. Bananos; cultivo y comercialización. 2a edición. San José, Costa Rica, ASBANA. 648 p.

SRINIVASA RAO, N.K.; CHACKO,E.C.; DORESWAMY,R. Y NARAYANSWAMY. 1982. Induction of growth in explanted inflorescence axis of banana. Curr. Sci. 51:666-667

STOTZKY, G.; COX. E.A. Y GOOS, R.D. 1962. Seed germination studies in *Musa*; II Scarification and aseptic germination of *Musa balbisiana*. Amer. Jour. Bot. 49(5):515-520.

TORRES, T.E. 1973. Situación nematológica del banano en Urabá en el trimestre Octubre - Diciembre de 1972. In Banano y plátano: enfermedades y plagas. Medellín, Colombia, AUGURA. 68 p.

TOWILL, L.E. 1981. *Solanum tuberosum*: A model for studying the cryibiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species. Plant Science Letters 20:315-324.

TOWILL, L.E. 1984. Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups Andigena, Phureja, Stenotomum, Tuberosum, and others tuber-bearing *Solanum* species. Cryo-Letters 5:319-326.

TOWILL, L.E. Y MAZUR, P. 1975. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Can. J. Bot. 53:1097-1102.

TUMANOV, I.I.; BUTENKO, R.G. Y OGOLEVETS, I.V. 1968. Application of isolated tissue culture technique for studying hardening process in plant cells.. Fiziol. Rast. 15:649-756.

URAGAMI, A.; SAKAI, A.; NAGAI, M. Y TAKAHASHI, T. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. Plant Cell Reports 8:418-421.

VULSTEKE, D. Y DE LANGHE, E. 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. Tropical Agriculture (Trinidad) 62:323-328.

VULSTEKE, D.R. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. IBPGR, Rome. 55p.

WILLIAMS, J.T. 1986. Banana and plantain germplasm conservationand movement and needs of research. In Banana and plantain breeding strategies: proceedings of an international workshop held at Cairns, Australia, 13-17 October, 1986. Ed. by G.J. Persley y E.A. De Langhe. ACIAR Proceedings No. 21, 187 p.

WITHERS, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR Technical Report. Rome; AGP:IBPGR/80/8. 91 p.

WITHERS, L.A. 1983. Germplasm storage in plant technology. In Plant Biotechnology. Ed. by Mantell and Smith Cambridge. p. 187-218.

WITHERS, L.A. 1984. Germplasm conservation *in vitro*: present state of research and its applications. In Crop genetic resources: conservation and evaluation. Ed. by J.H.W. Holden; J.T. Williams. London; George Allen & Unwin. p. 139-157.

WITHERS, L.A. 1985. Long-term storage of *in vitro* cultures. In *In vitro* techniques; Propagation and long term storage. Proceedings of a seminar in the CEC programme of co-ordination of research on plant productivity, held at Braunschweig. p 137-148.

WITHERS, L.A. 1987. The low temperature preservation of plant cell, tissue and organ cultures and seed for genetic conservation and improved agricultural practice. In The effects of low temperatures on biological systems. Ed. by B.W.W. Grout, G.J. Morris. Great Britain, Edward Arnold. p. 389-409.

WITHERS, L.A. *Musa* germplasm conservation. Prospects and problems of *in vitro* gene banks. IBPGR/INIBAP *Musa* Network Meeting.

WITHERS,L.A. 1980. Storage of plant tissue cultures. In Crop genetic resources: The conservation of difficult material. (Proceedings). Ed. by L.A. Withers y J.T. Williams.

WITHERS,L.A. 1983. Germplasm preservation through tissue culture: an overview. In Proceedings of the institute of genetics. Academia Sinica and IRRI. Beijing, China and Manila, Filipinas; Science Press

YAKAWA, H. Y OKA, S. 1982. Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of the mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) stored in liquid nitrogen. Annals of Botany 62:79-82.

A P E N D I C E

Análisis de varianza para la sobrevivencia de los embriones cigóticos de *Musa balbisiana* en los diferentes tratamientos y tiempos de deshidratación.

FUENTE DE VARIACION	G. L.	C. M.	PR F	C. V.
Tratamiento	2	83.8	0.9209 N.S.	46.76%
Deshidratación	4	1008.0	0.2595 N.S.	
Trat*Desh.	8	321.7	0.8773 N.S.	
Error	38	702.0		
Total	52			

N.S.= No significativo

Análisis de varianza para la germinación de los embriones de *Musa balbisiana* en los diferentes tratamientos y tiempos de deshidratación.

FUENTE	G. L.	C. M.	PR F	C. V.
Tratamiento	5	934.90	0.5901 N.S.	58.81 %
Deshidratación	4	362.46	0.8793 N.S.	
Trat*Desh	20	1071.12	0.6241 N.S.	
Error	23	1235.88		
Total	52			

N. S.= No significativo.