

# Influencia de la Temperatura en la Conservación *in vitro* de Germoplasma de *Musa*<sup>1</sup>

C. Núñez P\*, J. Sandoval\*\*, L. E. Müller\*

## ABSTRACT

The behavior of five *Musa* cultivars: Caribe Morado (AAA), Gros Michel (AAA), Horn Plantain (AAB), Pelipita (ABB) and Saba (ABB) was studied, using *in vitro* techniques, in relation to the effect of a reduction of the incubation temperature. Treatments were: 14°C, 16°C, 18°C, 20°C, with 28°C as the control. The culture medium consisted of a Murashige and Skoog (M.S.) salt mixture and organics, with the addition of BA and 0.7% Difco Bacto-agar as the gelling agent. With temperature reduction a corresponding reduction of the development of the explants could be observed. Since at 14°C growth was minimal, it can be surmised that the zero growth temperature is close to 12°C. No significant differences among the different types of germplasm were apparent. After six months incubation plantlet regeneration was possible in all treatments.

## COMPENDIO

Se estudió el comportamiento *in vitro* de cinco cultivares de *Musa*: Caribe Morado (AAA), Gros Michel (AAA), Curraré (AAB), Pelipita (AAB) y Saba (ABB), respecto al efecto de reducción de la temperatura durante la incubación. Se emplearon en los tratamientos las siguientes temperaturas: 14°C, 16°C, 18°C y 20°C y como testigo una a 28° centígrados. El medio de cultivo consistió en sales inorgánicas y orgánicas de Murashige y Skoog (M.S.) con adición de bencilaminopurina (BA), solidificado con 0.7% Difco Bacto-agar. La disminución de la temperatura provocó una reducción proporcional del desarrollo de los explantes. Puesto que a 14°C el crecimiento fue mínimo, la temperatura de cero crecimiento estaría alrededor de los 12° centígrados. No se encontraron diferencias significativas entre los tipos de germoplasma. Después de seis meses de incubación fue posible regenerar las plantas de todos los tratamientos.

Palabras clave: *Musa*, temperatura cero crecimiento, conservación de germoplasma.

## INTRODUCCION

En los últimos años la conservación de los recursos fitogenéticos ha recibido mucha atención, pues las pérdidas de germoplasma son cada vez más altas debido a la destrucción de las áreas naturales y a la mayor utilización de variedades mejoradas (10). Esta erosión genética reduce en muchas especies cultivadas la disponibilidad de variabilidad genética, base de todo proceso de fitomejoramiento.

Para proteger los recursos fitogenéticos se han iniciado, en escala mundial, programas de conservación prioritarios. En el caso de plantas con semillas ortodoxas, la conservación puede efectuarse almacenando

las semillas en cámaras refrigeradas con temperatura y humedad relativa bajas, por períodos relativamente largos. Por tratarse de plantas con semillas recalcitrantes o de propagación asexual obligada, la única manera de cultivarlas en el campo es en forma de jardines clonales. En el caso de *Musa* solamente es posible la formación de un banco de germoplasma en esta forma. Puesto que estas colecciones están expuestas a plagas, enfermedades, problemas edáficos, climáticos y de espacio, es cada vez más difícil su manutención (10). En *Musa* son varias las enfermedades que pueden causar la pérdida de germoplasma valioso, como el Mal de Panamá, y que son casi imposibles de controlar.

Una alternativa es la conservación *in vitro* (12, 17, 24, 30, 34, 38). Las labores de mantenimiento son, en comparación con una colección viva en el campo, reducidas y más baratas. Además el espacio requerido es mucho menor y el material se conserva en estado aséptico, lo que facilita el intercambio de germoplasma (16, 27, 28, 29).

Existen varias formas de conservar el material vegetal *in vitro*. La más sencilla es mantener los cultivos en

1 Recibido para publicación el 20 de marzo de 1990. Los autores agradecen a la Agencia Internacional para el Desarrollo de los Estados Unidos de América (USAID) por la ayuda prestada para la ejecución de esta investigación con el Grant 936-5542, *Innovative Scientific Research*

\* Centro Universitario del Atlántico, Universidad de Costa Rica (UCR).

\*\* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, C.R.

condiciones ambientales normales (1, 11, 13, 22, 31) o muy similares. Sin embargo, a esta temperatura, los explantes tienden a crecer mucho, por lo que se requieren frecuentes subcultivos. Por esa razón se ha tratado de mantener las colecciones *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo (6, 32), por lo que frecuentemente se ha reducido la temperatura (6, 14, 15, 19, 25, 36).

Temperaturas ultrabajas, como la del nitrógeno líquido, han sido también probadas en forma de criopreservación de germoplasma (3, 4, 5, 35, 37, 39). Sin embargo, este proceso todavía no es universalmente aplicable, debido a problemas de regeneración después de la descongelación, especialmente en especies tropicales (37, 38, 39).

Para reducir el crecimiento de material *in vitro* también se han empleado osmorreguladores, como sorbitol o manitol, para cambiar el potencial hídrico del medio de cultivo (18, 20, 23), retardadores químicos del crecimiento (20, 23, 26, 33), cambios en la presión de la atmósfera dentro del recipiente (8) y la cobertura del material con una capa de aceite mineral (2, 9).

En el presente trabajo se ha intentado determinar la temperatura de cero crecimiento para diferentes genótipos de *Musa*, para estudiar la posibilidad de conservar germoplasma a temperaturas por encima de este punto.

#### MATERIALES Y METODOS

Como material experimental se emplearon cinco cultivares de *Musa*: Caribe Morado (AAA), Gros Michel (AAA), Curraré (AAB), Pelipita (ABB) y Saba (ABB). El establecimiento de los tratamientos se comenzó con material previamente cultivado *in vitro* y multiplicado en un medio Murashige y Skoog (MS), que consistió en sales inorgánicas en forma de una mezcla comercial (KC Biological Inc., Lenexa, Kansas, EE.UU.), suplementada con sacarosa  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , mio-inositol  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , ácido nicotínico  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , tiamina-HCl  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , glicina  $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , Difco Bacto-agar  $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , bencilaminopurina (BA)  $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , ajustada a un pH de 5.8 previo al proceso de esterilización.

Como explantes se utilizaron yemas adventicias vigorosas separadas de los precultivos a aproximadamente 10 mm de longitud y 5 mm de diámetro en la base, con un peso de 0.2 gramos. Los explantes fueron inoculados en un medio MS idéntico al anterior, con la excepción de  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de BA. Como recipientes se emplearon tubos de vidrio con un diámetro de 2.5 cm, en cada uno de los cuales se colocó un explante. En

cada tratamiento se realizaron 20 repeticiones por cultivar. Los tubos se colocaron en incubadoras especiales Marca Percival, modelo I 35 LL, durante seis meses, a temperaturas de 14°C, 16°C, 18°C, 20°C y como testigo 28°C, con una oscilación de 0.5° centígrados. El fotoperíodo se ajustó a 16/8 h y la intensidad lumínica fue de 1.5001x en los cultivos, proporcionada por tubos fluorescentes de 40 W luz de día. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de variancia.

Al finalizar el período de experimentación se extrajeron las plántulas de los tubos y se cultivaron en un medio MS con adición de  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de BA a 28°C 0.5° centígrados. Después de dos meses se evaluó la capacidad de recuperación mediante observaciones del crecimiento y de la formación de raíces.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

En condiciones de temperatura relativamente alta (28°C) los explantes crecieron después de una fase inicial lenta, muy rápida y vigorosamente, y alcanzaron una altura (punta de la hoja más grande hasta la base del cormo) de 10 cm a 12 cm en dos meses. Después las plantas no desarrollaron mucho más, debido a la falta de espacio en el recipiente y al agotamiento de las reservas nutricionales en el medio. Al finalizar el tercer mes se habían tornado completamente cloróticas y comenzaron a marchitarse y secarse. Por esa razón los datos indicados en las figuras 1 y 2 para el testigo (28°C) representan apenas el crecimiento después de los primeros dos meses. En condiciones mejoradas su desarrollo hubiera sido mayor. En un experimento similar, El Gizawy y Ford-Lloyd (13) encontraron que plantas-testigo de ajo, mantenidas a una temperatura de 26°C, murieron ya después de cuatro meses. En ápices de manzano, Lundergan y Janick (19) verificaron el testigo a 26°C, y encontraron una reducción del 95% en la viabilidad después de nueve meses.

A una temperatura de 20°C, el desarrollo de los explantes, después de seis meses, fue muy positivo (Figuras 1 y 2). Se formaron entre cinco a seis hojas grandes y de apariencia normal. En todos los cultivares aparecieron numerosas raíces, provistas de pelos absorbentes. El seudotallo era grueso en su base y, apenas, algunas de las hojitas más viejas mostraron clorosis o se marchitaron. El cultivar Saba, que en todos los demás tratamientos mostró el menor crecimiento, tenía un peso excepcionalmente alto a 20°C, debido al mayor diámetro de la base del seudotallo.

En el tratamiento a 18°C se notó una reducción general del peso (Fig. 1) y del crecimiento longitudinal (Fig. 2). Se observó que los bananos con el genoma AAA mostraron un peso ligeramente superior, no sig-

nificativo, que los cultivares con el genoma AAB y ABB. A pesar del menor peso, el desarrollo de las plántulas fue completamente normal, con la formación de cuatro a cinco hojas y abundantes raíces en todos los cultivares.

y las hojas, a partir de los primordios existentes en los explantes, no formaron una lámina grande. Algunas veces sólo se formó el ápice, como inicio del desarrollo de la hoja. Las vainas más externas que mantenían encerrado al explante tenían una coloración verde-amarillenta. Sólo se formaron muy pocas raíces cortas en algunos de los explantes.

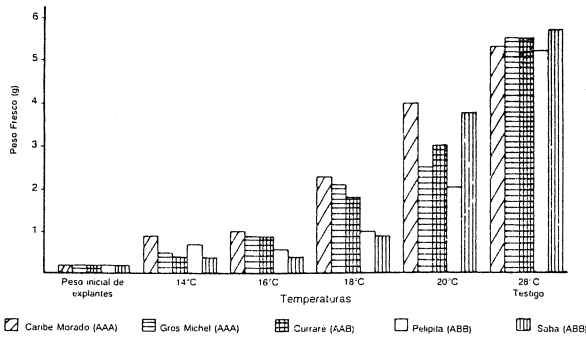


Fig. 1. Promedio de pesos de explantes de cinco cultivares de *Musa* después de seis meses de incubación *in vitro* en cuatro temperaturas diferentes.

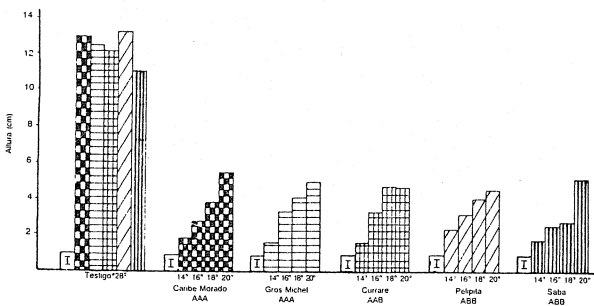
Nota: En el caso del testigo los datos son posteriores a los dos meses de incubación.

A menor temperatura, 16°C, se observó una mayor reducción en el desarrollo de los explantes. Esta fue proporcional en todos los cultivares y afectó tanto el peso como el crecimiento en altura (Figs. 1 y 2). Se formaron, apenas, dos o tres hojitas cuyas láminas permanecieron poco desarrolladas. Aparecieron raíces en todos los cultivares, pero en cantidad bastante reducida.

A una temperatura más baja, 14°C, casi no hubo crecimiento. El peso de los explantes apenas se duplicó

Al comparar el comportamiento de altura con el peso, se aprecia una correlación altamente significativa para los diferentes tratamientos. El análisis de variancia comprobó que no existían diferencias significativas en peso o altura entre los diferentes cultivares, pero sí entre todos los tratamientos. Sin embargo se puede observar en la Figura 1 que las pequeñas diferencias de peso entre cultivares fueron relativamente constantes en todos los tratamientos. Esto indica cierta respuesta diferencial, pues los tipos que contienen el genoma B fueron más afectados en su desarrollo que los bananos con solamente el genoma A por temperaturas bajas. Mientras que Miedema (21) no encontró diferencias en el comportamiento de diferentes genótipos de *Beta vulgaris* durante el almacenamiento a bajas temperaturas, Augereau *et al.* (2) informaron que las condiciones de almacenamiento en ambiente frío deberían ser muy diferentes para variedades de la misma especie.

Al proyectar la reducción del crecimiento con la disminución de la temperatura de almacenamiento se concluyó que posiblemente la temperatura de cero crecimiento se sitúa alrededor de 12°C, aunque, quizás en algunas variedades con solamente el genoma A (p.e. "Caribe Morado"), podría ser un poco más baja, o sea alrededor de 11° centígrados. Estas temperaturas son bastante más altas que las indicadas para muchas plantas de clima templado.



Leyenda: I= Tamaño inicial

Fig. 2. Efecto de cuatro temperaturas diferentes sobre el crecimiento longitudinal *in vitro* de cinco cultivares de *Musa* después de seis meses de incubación.

Nota: En el caso del testigo los datos son posteriores a los dos meses de incubación.

Banerjee y De Langhe (6) mencionaron que la mayoría de cultivos de ocho cultivares de *Musa*, mantenidos a 10°C por tres meses, se tornaron de color marrón y murieron, mientras que a 15°C todos se mantuvieron normales, aun después de 12 a 15 meses, con apenas poco ennegrecimiento.

El efecto de las temperaturas bajas durante la supervivencia se puede apreciar en el Cuadro 1. Se puede ver que después de seis meses de almacenamiento la tasa fue bastante alta en todos los tratamientos. Banerjee y De Langhe (6) reportaron que a 15°C la supervivencia de variedades con genoma B, comparada con la de aquellas que solamente tienen el genoma A, fue idéntica, pero después de nueve meses de almacenamiento se notó una reducción drástica en variedades que sólo contienen el genoma A.

**Cuadro 1. Efecto de la temperatura de conservación *in vitro* para cinco cultivares de *Musa* en el porcentaje de supervivencia después de un período de incubación de seis meses.**

Cultivar	Temperatura				
	14°C	16°C	18°C	20°C	28°C (testigo)
Caribe Morado	80	85	100	100	0
Gros Michel	85	75	100	100	0
Curraré	85	85	100	100	0
Pelipita	95	95	100	100	0
Saba	90	95	100	100	0

La regeneración de plántulas fue fácil una vez transferidos los explantes tratados a un medio MS nuevo con 0.5 mg BA, y mantenidos a una temperatura de 28° centígrados. Tampoco hubo ningún efecto sobre la capacidad de proliferación activa, a 28°C en un medio MS con 4 mg de BA. Sólo el testigo no sobrevivió el tiempo completo (seis meses), debido a los problemas antes mencionados.

Las reducciones observadas en la tasa de supervivencia, especialmente en los tratamientos con temperaturas más bajas, se deben exclusivamente a contaminaciones con hongos y bacterias (Cuadro 1). Este problema fue también encontrado por Bhojwani (7) en trébol, y por Dale (11) en *L. multiflorum*. Una tasa de supervivencia del 75% en *B. vulgaris* fue reportada por Miedema (21).

**CONCLUSIONES**

De los datos obtenidos en el presente estudio se puede concluir que el comportamiento de los diferentes cultivares (genótipos) de *Musa* fue bastante similar al disminuir la temperatura de almacenamiento y que, posiblemente, la de cero crecimiento se sitúa alrededor de 11°C a 12° centígrados. Puesto que la supervivencia y capacidad de regeneración fueron altas después de seis meses, es posible mantener colecciones de germoplasma de *Musa* a una temperatura de 16°C a 17°C durante un tiempo considerable, sin tener que efectuar subcultivos. No se sabe si el estrés impuesto por la reducción de temperatura tenga un efecto inductor en la variación somaclonal. El uso de osmorreguladores, en conjunto con las bajas temperaturas, quizá podría representar el sistema ideal para almacenar germoplasma de *Musa* a corto y mediano plazo.

**LITERATURA CITADA**

1. ALAN, J.J. 1979. Tissue culture storage of sweet potato germplasm. Ph.D. Thesis. Great Britain, University of Birmingham. 253 p.
2. AUGEREAU, J.M.; COURTOIS, D.; PETIARD, V. 1986. Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil overlay. *Plant Cell Reports* 5:372-376.
3. BAJAJ, Y.P.S. 1976. Gene preservation through freeze-storage of plant cells, tissue and organ culture. *Acta Horticulturae* 63:75-84.
4. BAJAJ, Y.P.S. 1979. Establishment of germ plasm banks through freeze-storage of plant tissue culture and their implications in agriculture. In *Plant cell and tissue culture: Principles and applications* (W.R. Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddock, V. Raghavan (Eds.)). Columbus, Ohio University Press. p. 745-774.
5. BAJAJ, Y. 1979. Technology and perspective of cryopreservation of germplasm. *Euphytica* 28:267-285.
6. BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Reports* 4:351-354.
7. BHOJWANI, S.S. 1981. A tissue culture method for propagation and low temperature storage of *Trifolium repens* genotypes. *Physiologia Plantarum* 52:187-190.
8. BRIDGEN, M.P.; SHARP, W.; STABY, G.L. 1978. Effects of low pressure on the preservation of tissue cultures of *Chrysanthemum morifolium*. *Calgary International Association of Plant Tissue Culture. Abstract* 1207. p. 106.
9. CAPLIN, S.M. 1959. Mineral-oil overlay for conservation of plant tissue cultures. *American Journal of Botany* 46:324-329.
10. CROP GENETIC resources for today and tomorrow. 1975. O.H. Frankel, J.G. Hawkes (Eds.). Cambridge, Cambridge University Press.
11. DALE, P. 1980. A method for *in vitro* storage of *Lolium multiflorum* Lam. *Annals of Botany* 45:497-502.
12. DE LANGHE, E. 1984. The role of *in vitro* technique in germplasm conservation. In *Crop genetic resources, conservation and evaluation*. J.H. Holden, J.T. Williams (Eds.). London, George Allen and Unwin. p. 131-137.
13. EL-GIZAWY, A.M.; FORD-LLOYD, B.V. 1987. An *in vitro* method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum*) germplasm. *Plant Cell. Tissue. Organ Culture* 9:147-150.
14. GALZY, R. 1969. Recherches sur la croissance de *Vitis rupestris* Scheele sains et court noué cultivé *in vitro* à différentes températures. *Annales de Phytopathologie* 1:149-166.
15. HIRAOKA, N.; KODOMA, T. 1984. Effects of non-frozen cold storage on the growth, organogenesis and secondary metabolism of callus culture. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture* 3:349-357.

16. KAHN, R.P. 1986. Plant quarantine and international shipment of tissue culture plants. In Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. R.H. Zimmerman, R.J. Griesbach, F.A. Hammerschlag, R.H. Lawson (Eds.). Dordrecht, Martinus Nijhoff Publ. p. 147-164.
17. KARTHA, K. 1981. Genepool conservation through tissue culture. In Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants. Proceedings COSTED and ANBS A. Rao (Ed.). University of Singapore. p. 213-218.
18. KIMBALL, S.L.; BEVERSDORF, W.A.; BIGHAM, E.I. 1975. Influence of osmotic potential on the growth and development of soybean tissue culture. *Crop Science* 15:750-753.
19. LUNDERGAN, C.; JANICK, J. 1979. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. *HortScience* 14:514.
20. MARETZKI, A.; THOM, M.; NICKELL, L.G. 1972. Influence of osmotic potentials on the growth and chemical composition of sugarcane cell culture. *Hawaiian Sugar Planters Record* 58(15):183-199.
21. MIEDEMA, P. 1982. A tissue culture technique for vegetative propagation and low temperature preservation of *Beta vulgaris*. *Euphytica* 31:635-643.
22. MIX, G. 1982. *In vitro* preservation of potato material. *Plant Genetic Resources Newsletter IBPGR (Roma)* 51:6-8.
23. MORA M., M.I. 1987. Uso de osmorreguladores e inhibidores químicos para la conservación del germoplasma *in vitro* de *Musa* sp. Tesis M. Sc. Turrialba, CATIE-Universidad de Costa Rica.
24. MOREL, G. 1975. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. In *Crop genetic resources for today and tomorrow*. O.H. Frankel, J.G. Hawkes (Eds.). Cambridge, Cambridge University Press. p. 327-332.
25. MULLIN, R.H.; SHLEGEL, D.E. 1976. Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. *HortScience* 11(2):100-101.
26. MURASHIGE, I.; SKOOG, F. 1965. Effects of stem elongation retardants and gibberellin on callus growth and organ formation in tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 18:665-672.
27. PARLIMAN, B.J. 1986. Tissue culture techniques and plant introduction/quarantine procedures. In *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. R.H. Zimmerman, R.J. Griesbach, F.A. Hammerschlag, R.H. Lawson (Eds.). Dordrecht, Martinus Nijhoff Publ. p. 271-282.
28. ROCA, W. 1979. Métodos de cultivo de tejidos para el intercambio internacional y la conservación del germoplasma de la yuca. *Boletín Informativo CIAT (Col.)* 6:3-5.
29. ROCA, W.M.; BRYAN, J.E.; ROCA, M.R. 1979. Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources. *American Potato Journal* 56:1-10.
30. STARITSKY, G. 1980. *In vitro* storage of aroid germplasm. *Plant Genetic Resources Newsletter IBPGR (Roma)* 42:25-27.
31. WESTCOT, R.; HENSHAW, G.; ROCA, W. 1977. Tissue culture storage of potato germplasm: Culture initiation and plant regeneration. *Plant Science Letters* 9:309-315.
32. WESTCOT, R. 1981. Tissue culture storage of potato germplasm. I. Minimal growth storage. *Potato Research* 24:331-342.
33. WESTCOT, R. 1981. Tissue culture storage of potato germplasm. II. Use of growth retardants. *Potato Research* 24:343-352.
34. WILKINS, C.P.; BENGOCHEA, T.; DODDS, J.H. 1982. The use *in vitro* methods for plant genetic conservation. *Outlook on Agriculture* 11:67-72.
35. WITHERS, L.A. 1980. Low temperature storage of plant tissue cultures. In *Advances in biochemical engineering*. A. Fiechter (Ed.). Berlin, Springer. v.18, p. 102-150.
36. WITHERS, L.A. 1980. Cryopreservation of plant cell and tissue cultures. In *Tissue culture for plant pathologists*. D. Ingram, I. Helgeson (Eds.). Oxford, Blackwell.
37. WITHERS, L.A. 1980. The cryopreservation of higher plant tissue and cell cultures: An overview with some current observations and future thoughts. *Cryo-Letters* 1:239-250.
38. WITHERS, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. Roma, International Board of Plant Genetic Resources, IBPGR Secretariat. IBPGR/80/8.
39. WITHERS, L.A. 1981. Germplasm conservation *in vitro*: Present state of research and importance of cryopreservation. A technical report. Roma, International Board of Plant Genetic Resources (IBPGR). p. 6-10.