

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA

PROGRAMA DE POSGRADO

Criopreservación de Callos de ssp. Malaccensis
Musa Gran Enano (AAA), y Musa acuminata (AA)

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 Inés Dávila Prado

CATIE

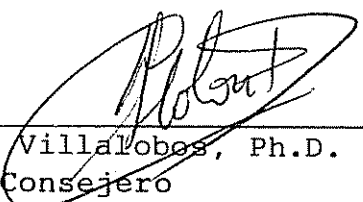
Turrialba, Costa Rica

1991


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 al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE


COMITE ASESOR:


P/

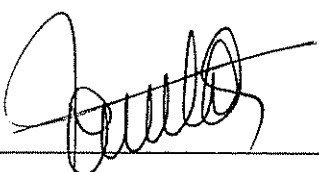
Víctor M. Villalobos, Ph.D.
Profesor Consejero



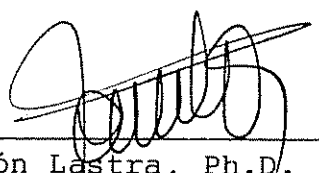
Ana Abdelnour, M.Sc.
Miembro del Comité




Magali Dufour, Ph.D.
Miembro del Comité



Ramón Lastra, Ph.D.
Miembro del Comité



Ramón Lastra, Ph.D.
Coordinador Programa de Maestría



María Inés Dávila Prado
Candidato

AGRADECIMIENTO

A la M.Sc. Ana Abdelnour, por sus valiosas enseñanzas y estímulos, que permitieron la culminación de este trabajo.

Al Dr. Victor Villalobos, por sus valiosos aportes en el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Vincent Escalant quien gentilmente aportó material biológico empleado en esta investigación y sus observaciones en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Ramón Lastra y la Dra. Magali Dufour por sus valiosas sugerencias en la elaboración de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, por brindarme la oportunidad de superarme como profesional.

A MIP-NORAD por brindar el financiamiento de mis estudios.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	viii
SUMMARY	x
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	6
2.1 Botánica del Género <u>Musa</u>	6
2.2 Taxonomía y Clasificación	7
2.1.1 Grupo AA	9
2.1.2 Grupo AAA	10
2.1.3 Grupo AAB	11
2.3 Mejoramiento Genético en Musa	12
2.4 Objeto de la Conservación	15
2.5 Formas de Conservación	16
2.6 Conservación en Bancos de Semilla	16
2.7 Conservación in vitro	17
2.8 Criopreservación	17
2.8.1 Mecanismo de acción de los Crioprotectores	19
2.8.2 Toxicidad de Crioprotectantes	21
2.8.3 Etapas de proceso de la Criopreservación	22
2.8.3.1 Pretratamiento	22
2.8.3.2 Crioprotección	23
2.8.3.3 Congelamiento	25
2.8.3.4 Descongelamiento	26

2.8.3.5	Pruebas de Viabilidad	26
2.8.3.6	Recultivo	27
2.8.4	Crioconservación de callos	27
2.8.5	Crioconservación de Suspensiones Celulares.	29
2.8.6	Crioconservación de embriones	32
2.8.7	Crioconservación de protoplastos	34
2.8.8	Crioconservación de semillas	35
2.8.9	Criopreservación de pólen	35
2.8.10	Criopreservación de otras estructuras	36
III.	MATERIALES Y METODOS	38
3.1	Material Vegetal	38
3.2	Inducción de callos	38
3.3	Preparación para el congelamiento de callos diploides. <u>Musa acuminata</u>	39
3.4	Congelamiento de callos Gran Enano	41
3.5	Análisis de sobrevivencia.	42
3.6	Análisis estadístico	42
IV.	RESULTADOS	43
4.1	Producción de callos	43
4.2	Crioconservación de callos	45
4.2.1	Crioconservación de callos de <u>Musa acuminata</u> spp <u>Malaccensis</u> (AA)	45
4.2.2	Crioconservación de callos de Gran Enano	48
V.	DISCUSION	51
5.1	Producción de Callos	51
5.2	Crioconservación de callos	53
5.3	Crioconservación de callos de Gran Enano	56

VI.	CONCLUSIONES	58
VII.	RECOMENDACIONES	60
VII.	BIBLIOGRAFIA	61

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1.	Tratamientos empleados en el congelamiento rapido de callos diploides de <u>Musa acuminata</u> ssp. <u>Malaccensis</u> .	40
CUADRO 2.	Formación de callos a partir de tejido subapical de Gran Enano expresado en porcentaje.	44
CUADRO 3.	Inducción de callos en tejidos subapical de Curraré expresado en Porcentaje.	45
CUADRO 4.	Porcentaje de sobrevivencia de callos embriogénicos, de <u>Musa acuminata</u> ssp. <u>Malaccensis</u> utilizando DMSO y sacarosa.	46
CUADRO 5.	Preenfriamiento y congelación de callos embriogénicos de <u>Musa acuminata</u> ssp. <u>Malaccensis</u> .	48
CUADRO 6.	Congelamiento rápido en Nitrógeno Líquido de callos de Gran Enano.	48
CUADRO 7.	Ensayo congelamiento Gran Enano, tasa de enfriamiento inicial 1°C/min.	49
CUADRO 8.	Ensayos gran enano tasa inicial de enfriamiento 0.5°C/m y 1°C/min.	50

DAVILA P, M.I. 1991. Criopreservación de callos de Musa Gran Enano (AAA) y Musa acuminata ssp. Malaccensis. Tesis Mg.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 65 p.

Palabras Claves: Musa Gran Enano, Musa acuminata ssp. Malaccensis, callos, criopreservación, crioprotección, congelamiento rápido, congelamiento lento, tasa de sobrevivencia, almacenamiento de germoplasma.

RESUMEN

Callos de tejidos subapicales de Musa Gran Enano y callos embriogénicos de Musa acuminata ssp. Malaccensis fueron evaluados en su capacidad de sobrevivir al congelamiento en Nitrógeno Líquido (NL, -196°C). Los callos fueron pretratados con concentraciones crecientes de sacarosa y de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y congelados en forma rápida y lenta en NL.

Los ensayos realizados para la producción de callos Musa Gran Enano muestran que en medio MS (1962) enriquecido con 1 mg/l Picloram y 1 mg/l Cinetina se obtiene hasta un 80% de producción de callos. Callos de Musa acuminata ssp. Malaccensis que fueron tratados por 24 y 48 horas en 0.5M de Sacarosa y congelados rápidamente en NL sobreviven en un 80% y 75% después del congelamiento. Callos de Musa acuminata congelados lentamente sobreviven en 65% cuando son

pretratados con 0.5M Sacarosa por 24 horas y en ausencia de DMSO.

Los ensayos de congelamiento rápido con callos de Musa Gran Enano pretratados con 0.5M de sacarosa por 72h sobreviven en 75%, cuando el congelamiento de los mismos se realizó en forma lenta los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó sacarosa 0.5M por 24 y 48 horas y 5% DMSO con un 80 y 75% de sobrevivencia respectivamente.

DAVILA P, M.I. 1991. Cryopreservation of callus Musa Grand Naine and Musa acuminata ssp. Malaccensis. Master of Science Thesis. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 65 p.

Palabras Claves: Musa Grand Naine, Musa acuminata ssp. Malaccensis, callus, cryopreservation, cryoprotection, direct freezing, slow cooling, survival rate, germplasm storage.

SUMMARY

Embriogenic callus from inmature embryos of Musa acuminata ssp. Malaccensis and callus from subapical tissues of Musa Grand Naine were tested by their ability to survive freezing in liquid nitrogen (-196°C). Callus were pretreated with increasing sucrose concentration and/or dimetyl sulfoxide (DMSO) and frozen by rapid or slow cooling.

Assays to induce the production of callus of Grand Naine showed that the Murashige and Skoog medium enriched with 1 mg/l of Picloram and 1 mg/l of Kinetin induced up to 80% callus production. Callus of M. acuminata ssp. Malaccensis treated with 0.5M sucrose for 24 hours and 48 hours and frozen rapidly in liquid nitrogen survived at rates of 80% and 75% respectively.

When these callus were frozen slowly 65% survival was observed when pretreated with 0.5M sucrose for 24 hours in the absence of DMSO.

Rapid freezing experiments with callus of Musa Gran Naine pretreated with 0.5M sucrose for 72 hours survived at a rate of 75%. When slow freezing was tested, the best survival rates were obtained using a mixture of DMSO and 0.5M sucrose for 24 hours and 48 hours as pretreatment (80% and 75% respectively).

I. INTRODUCCION

En la historia de la agricultura, las plantas cultivadas han sido domesticadas a diferentes ambientes y sistemas de cultivo. A través de selección natural, las plantas cultivadas han desarrollado resistencia a plagas y enfermedades. Este proceso ha conducido a una gran diversidad genética en los cultivos tradicionales en todo el mundo (IBPGR, 1990). Mantener esta diversidad genética es vital para la seguridad alimentaria. Los fitomejoradores requieren de la variabilidad de especies primitivas y silvestres para la obtención de variedades mejoradas.

La introducción de una variedad mejorada, ha desplazado los materiales autóctonos, los cuales tienden a desaparecer cuando no se tiene la precaución de conservarlos. Consecuentemente se han perdido individuos cuya selección, costó cientos o miles de años y que representaban el resultado de las experiencias de varias generaciones de agricultores. Esto es lo que se conoce como erosión genética la cual, puede tener efectos irreversibles (Blanco, 1985).

La mayoría de las especies son afectadas de una u otra manera por la erosión genética, el género Musa no es la excepción y poco a poco representantes de plátano y banano desaparecen debido a desastres naturales, agricultura nómada y deforestación (Sandoval, Muller, 1989). La conservación de estos recursos es de vital importancia para mantener la variabilidad en especies domésticas y silvestres y como fuente de alimento para millones de personas en las regiones tropicales del mundo. El IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) consideró la conservación del germoplasma de Musa una actividad prioritaria tipo uno (IBPGR, 1978; 1983).

La forma más conveniente de mantener el germoplasma vegetal es mediante el almacenamiento de sus semillas, sin embargo, esto no es posible en plantas con semillas recalcitrantes y de reproducción vegetativa como bananos y plátanos (Panis et al, 1990; Villalobos, et al, 1991). Por tal razón se han desarrollado métodos alternativos de conservación para estas especies. Las colecciones de campo son una opción, sin embargo este método de conservación demanda mucha mano de obra, espacio, además exponen las colecciones a enfermedades y plagas, desastres naturales, errores humanos, y sujeto a políticas institucionales y gubernamentales. (Villalobos, Abdelnour, 1991)

La creación de bancos de germoplasma genéticos representa una de las más importantes posibilidades para lograr la preservación de la riqueza genética en el mundo. Estas acciones fueron iniciadas a principio de siglo por el genetista soviético V.L. Vavilov (Blanco, 1985). Los métodos de cultivo de tejidos vegetales in vitro se presentan como otra opción viable en el establecimiento de colecciones (Rublúo, 1985). Este método presenta ciertas ventajas como son:

- Conservar materiales limpios, almacenar un gran número de introducciones en un espacio reducido; los materiales no están expuestos a problemas edáficos, climáticos, plagas y enfermedades.
- Se reducen los costos de mantenimiento.

Las colecciones in vitro pueden estar sometidas a condiciones de crecimiento normales o limitadas. En el almacenamiento a corto y mediano plazo es deseable extender el intervalo de subcultivos porque; ocurren divisiones celulares y pueden surgir mutaciones o variaciones; cada vez que se realiza el subcultivo se aumenta los riesgos de pérdida debido a contaminación o error humano (Panis et al, 1990).

El almacenamiento de estructuras por períodos indefinidos con garantía de su estabilidad genética, se logra mediante la criopreservación. (Karthá, et al, 1981)

En la Criopreservación (almacenamiento en Nitrógeno líquido, -196°C), se detiene toda actividad metabólica. (Rubluó, 1985). Al mantener las células a ultra bajas temperaturas, no hay división celular o cambios genéticos que puedan producirse con el tiempo, manteniéndose la identidad genética del material preservado. (Whithers y Street, 1976). La técnica de criopreservación ha sido utilizada en muchas especies vegetales, siendo aplicable a protoplastos, células, callos, meristemos, embriones somáticos y embriones cigóticos (Engelman et al, 1985).

Hasta ahora los ensayos de criopreservación de Musa, han sido desarrollados en suspensiones celulares de Musa (AAB) (Panis; et al, 1990) y embriones cigóticos de Musa acuminata y Musa balbisiana (Mora, 1990; Villalobos, Abdelnour, et al, 1991)

La conservación de genotipos de variedades cultivadas e igualmente de especies silvestres son de gran importancia para los programas de mejoramiento. La diversidad genética está presente en gran medida en especies progenitoras diploides. Los triploides (Musa AAB) son frutos tropicales de gran interés económico debido a su importancia en la dieta humana.

En este trabajo se presenta una metodología de criopreservación de callos de Musa Gran Enano (AAA) y callos embriogénicos diploides (AA) de Musa Acuminata ssp.

Malaccensis, los cuales fueron pretratados a diferentes concentraciones de sacarosa y sulfóxido de dimetilo (DMSO), y sometidos a congelamiento lento y rápido en Nitrógeno Líquido.

El congelamiento de callos ha resultado exitoso en Triticum aestivum L. (Chen, et al, 1985); Medicago sativa (Finkle, et al, 1980); Saccharum sp. (Ulrich, et al, 1984; Oryza sativa L. (Ulrich, et al, 1982).

La conservación a largo plazo de callos de Musa Gran Enano y Musa acuminata ssp. Malaccensis contribuirá al desarrollo de programas de mejoramiento genético en Musa.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 BOTANICA DEL GENERO Musa

Los bananos y plátanos son plantas herbáceas, con pseudotallos compuesto de vainas foliares, originadas de cormos en los que se desarrollan yemas laterales. Las hojas nacen en espiral, las primeras son escamosas, seguidas de hojas angostas. Las vainas foliares están formando el pseudotallo (Purseglove, 1981). La inflorescencia es terminal y crece por el centro del pseudotallo, hasta alcanzar el follaje y emerge (Soto, 1985). La inflorescencia es una espiga compleja y consiste de un pedúnculo en el que las flores están distribuidas en racimos nodales. Los racimos florales y brácteas nacen en espiral y no rodean el pedúnculo (Purseglove, 1981).

Cada pseudotallo produce solo una inflorescencia y luego muere, su ciclo de vida puede continuarse por la formación de "hijuelos laterales" lo que permite su propagación vegetativa (De Langhe, 1969).

Las flores son zigomórficas, con el perianto dividido en dos partes; un conjunto de cinco pétalos unidos en posición abaxial, y un tépalo libre en posición adaxial. Las flores femeninas poseen ovario desarrollado, estilo grande y estambres reducidos estaminoides; las masculinas

presentan ovario abortivo, estilo y estigma reducidos y anteras muy desarrolladas (Stover y Simmonds, 1987).

En especies silvestres seminíferas, la polinización es indispensable en la formación del fruto. El fruto maduro presenta semillas negras y duras con escasa pulpa.

En la semilla madura el embrión presenta una porción agrandada denominada haustorio, y otra angosta que representa el eje epicotilo - hipocotilo - radícula, así como una parte del cotiledón (Mc Grahán, 1961).

2.2 TAXONOMIA Y CLASIFICACION

Las Musáceas pertenecen al Orden Zingiberales, está constituida por dos géneros: Musa y Ensete (Soto, 1990). El género Musa se divide en cuatro secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys y Eumusa (Stover y Simmonds, 1987). La sección Eumusa incluye bananos y plátanos comestibles, así como sus parientes silvestres (De Langhe, 1969). Está constituida por nueve o diez especies, entre ellas, Musa acuminata y Musa balbisiana, las que han originado la mayoría de los cultivares de banano y plátanos comestibles a través de cruzamientos interespecíficos (Stover y Simmonds, 1987). El más amplio crecimiento son triploides de los siguientes grupos genómicos: AAA, AAB y ABB (Escalant, 1989).

Musa acuminata contiene mayor variabilidad genética, es un diploide (AA) con un número de cromosomas de $2n = 22$. Es una planta de porte bajo, con pseudotallos delgados y sistema foliar reducido, de coloración pardusca, que se convierten en manchas heterogéneas, definidas en las láminas de las hojas (Soto, 1990). Los racimos crecen horizontalmente, son pequeños, con dedos muy delgados que producen semilla (Stover y Simmonds, 1987).

Musa balbisiana (BB) $2n = 22$, es una especie de plantas vigorosas con sistema foliar y pseudotallo de color verde claro. Su racimo es compacto, frutos globosos con semillas. Estas plantas presentan alta resistencia a condiciones ecológicas adversas y a las pestes más comunes del banano (Soto, 1990).

La composición de ploidía y genómica de los diferentes cultivares, están representados con A para señalar la procedencia de los genomas de M. acuminata y B para la de Musa balbisiana. Los híbridos interespecíficos se agrupan según la contribución de cada una de las especies silvestres a la ploidía. De acuerdo a la combinación de genomas, se encuentran tipos diploides, triploides, y tetraploides. En la naturaleza se identifican AA, AB, BB, AAA, AAB y ABBB (Stover y Simmonds, 1987).

2.1.1 Grupo AA

El grupo AA según Simmonds (1973) es el único diploide comestible del tipo acuminata. En este grupo se encuentran cultivares partenocarpías que pueden ser fértiles. Se le conoce con el nombre de "Lady's Finger". Las plantas de este grupo se caracterizan por tener poco vigor, aunque pueden crecer hasta cuatro metros de altura. El área foliar es pequeña, con hojas largas y angostas de color verde amarillento. Los pseudotallos son delgados y los cormos pequeños. Soportan muy bien la acción del viento, resultando de un eficiente sistema radical. Son resistentes a la "Enfermedad de Panamá" (Fusarium oxysporum) y muestran poca susceptibilidad a la "Sigatoka Negra" (Mycosphaerella fijiensis). La planta produce racimos pequeños con dedos cortos, gruesos y rectos. Su pulpa es blanca o amarilla, suave, pastosa, muy dulce y con mucho aroma. La cáscara es muy delgada y la cutícula muy sensible a magulladuras (Soto, 1990).

El desarrollo de bananos comestibles es resultado de la selección de M. acuminata. Los cultivares AA originaron la formación de triploides AAA a través de restitución cromosómica durante la meiosis (INIBAP, 1989)

2.1.2 Grupo AAA

Está constituido por varios tipos de bananos con algunas semejanzas entre sí (Soto, 1990). La separación de estos, requiere de la aplicación de una clave descrita por Simmonds (1973) así: "Gros Michel", Subgrupo Cavendish, y "Red".

Las plantas de "Gros Michel" poseen gran vigor y producen un fruto grande, la cáscara es gruesa y la cutícula dura. El fruto tiene forma de cuello de botella, vainas interiores verde o rosado pálido, fruto de color amarillo brillante a la madurez.

El Subgrupo Cavendish presenta frutos con punta roma, vainas interiores rojo brillante, fruto verdoso a la madurez a este subgrupo pertenece el "Gran enano", que se caracteriza por presentar plantas semienanas de gran vigor, con extensa área foliar, pseudotallo grueso muy resistente; el cormo es grande con un sistema radical extenso, raíces gruesas y fuertes. Las plantas de Gran Enano son muy susceptibles al ataque de nemátodos y al de "Sigatoka Negra" (Soto, 1990).

Las plantas "Red", "Green red" poseen frutos gruesos, tres o cuatro veces más largos que anchos, sin curva o ligeramente curvas.

2.1.3 Grupo AAB

De acuerdo a Simmonds (1973) se divide en tres tipos:

- a) "French plantain", eje masculino persistente generalmente envuelto por remanentes de flores masculinas y brácteas.
- b) "Falso cuerno" con eje masculino decíduo.
- c) Tipo "Horn Plantain"

El tipo más importante es el "Horn Plantain" conocido como "Curraré" posee frutos grandes y racimos medianos con regular cantidad de dedos. Las plantas son moderadamente vigorosas y resistentes a la "Enfermedad de Panamá", y a la "Sigatoka".

El desarrollo de nuevos cultivares es probablemente dependiente del uso de una más amplia base genética de M. acuminata y M. balbisiana, de la selección de los híbridos existentes y el uso de especies silvestres como material inicial (Shepherd et al, 1986).

Los bananos son unas de las pocas frutas en las que los cultivares desarrollados por métodos controlados de mejoramiento no han reemplazado a

aquellas que se producen a través de la evolución natural (Rowe, 1985).

2.3 MEJORAMIENTO GENETICO EN Musa

En el mejoramiento del banano, es muy importante el grado de ploidía. Los clones triploides predominan en el grupo de bananos que pertenecen a la sección Eumusa, es decir, cultivares de M. acuminata y M. balbisiana. La triploidía confiere mayor vigor a la planta, mayor productividad y es causa de esterilidad, acompañada de la partenocarpia, que es característica determinante en la selección que el hombre ha hecho hacia los clones triploides. Los triploides híbridos presentan un grado de viabilidad mayor, ya que M. acuminata les confiere cualidades de resistencia a enfermedades, calidad del fruto y resistencia a condiciones de sequía; M. balbisiana, por otra parte, contribuye con otros caracteres aumentando la viabilidad (Soto, 1990).

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, 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).

A través de los años, el hombre ha tendido a seleccionar los linajes más vigorosos y con menos semilla que gustan más y éste fue el proceso por el cual los triploides estériles llegaron a predominar en las plantaciones. Los tetraploides naturales son sorprendentemente raros. Otros en existencia han resultado de la actividad de los fitomejoradores (Menéndez y Shepherd, 1975).

Las técnicas de hibridación en banano, consisten en aislar inflorescencia o las flores femeninas durante el período de receptividad y situar el polen fresco sobre los estigmas. Las semillas que se obtienen en número variable, generalmente muy pequeñas, se hacen germinar y las pequeñas plantas se desarrollan en invernadero, para luego trasladarse al campo donde se seleccionan por sus características deseables.

Existen diversos programas de mejoramiento en Musa, Brazil y Honduras, utilizan en sus programas la fertilidad femenina residual de algunos triploides que hibridizan con diploides para la creación de tetraploides fértiles. El programa desarrollado en Francia usa diploides mejorados AA, BB en los que doblan su genoma empleando colchicina para dar tetraploides de tipos AAAA, AABB, los que se cruzan con diploides mejoradas para producir plantas triploides.

M. acuminata es el diploide que más se ha utilizado en los programas de mejoramiento. La resistencia a la Sigatoka (Mycosphaerella musicola y M. fijiensis) fue encontrada en varias subespecies de M. acuminata, especialmente la subespecie Malaccensis, cuya resistencia es controlada por muchos genes dominantes. También se han localizado fuentes de resistencia a las tres razas del "Mal de Panamá" y al nemátodo barrenador (Radopholus similis) (Shepherd, 1986). M. acuminata ssp. burmanicoides presenta alta resistencia a la "Sigatoka Negra" (Rowe, 1985).

Las técnicas de cultivo in vitro representa la complementariedad del mejoramiento de Musa por programas convencionales. Sobre todo por el hecho de que las variedades consumibles son triploides, estériles y difíciles de mejorar con hibridización.

El cultivo de embriones de Musa ha sido una ayuda muy valiosa en los programas de genética y la técnica ha sido de gran utilidad en el mejoramiento de los diploides resistentes a R. similis (Rowe y Richardson, 1975).

Plantas obtenidas por cultivo de meristemas muestran gran estabilidad genética, ya que al cultivar otros tejidos somáticos existe la posibilidad de generarse células en condiciones de aneuploidía y euploidía (Alvarez, Jaramillo y Macías, 1982).

El cultivo de protoplastos, se presta para un avance mayor en la técnicas de mejoramiento genético, al permitir no sólo la propagación sino facilitar programas de hibridación somática, ya que una vez eliminada la pared celular es posible lograr la fusión de células de clones tolerantes o resistentes a un determinado patógeno con clones de alta producción y la aceptación de la fruta en los mercados (Angarita y Castro, 1984).

En la actualidad la producción de plantas haploides, variantes somaclonales, suspensiones celulares y fusión de protoplastos e ingeniería genética, asociados con técnicas de hibridación con diploides, representan nuevas estrategias en el mejoramiento de Musa (Escalant y Teisson, 1989).

2.4 OBJETO DE LA CONSERVACION

El objeto de la conservación de germoplasma vegetal es mantener la diversidad genética en una condición estable. Los recursos fitogenéticos son la base para todo programa de mejoramiento, en el que se desea obtener cultivares de mayor rendimiento.

Para muchos cultivos con semillas ortodoxas la conservación del germoplasma vegetal puede ser llevado a cabo en bancos de semilla, sin embargo, en aquellos casos en que las plantas producen semillas recalcitrantes no resisten el almacenamiento a bajas temperaturas, con alto grado de deshidratación, o son cultivos clonales estériles, es

necesario otro tipo de conservación. Muchas raíces y tubérculos de importancia alimenticia y frutos como banano y plátano presentan estas características.

2.5 FORMAS DE CONSERVACION

La conservación de germoplasma puede realizarse in situ; es decir en el lugar que ocupan naturalmente: bosques, campos de cultivo, orillas de caminos. Esto implica que el sitio debe mantenerse en su estado natural, evitando la interferencia del hombre y de los animales domésticos. En la mayoría de las especies cultivadas resulta muy difícil y costoso mantener los ambientes naturales como fuentes de germoplasma. (CATIE/GTZ, 1979).

Las colecciones en el campo representan otra forma de conservación, sin embargo presenta los inconvenientes de estar expuesto a enfermedades, plagas, desastres naturales, problemas edáficos, climáticos y de espacio, además de los altos costos de mantenimiento (Sandoval, 1989).

2.6 CONSERVACION EN BANCOS DE SEMILLA

Las semillas ortodoxas se pueden conservar bajo condiciones de bajas temperaturas y humedad relativa. Sin embargo el almacenamiento de semillas en estas condiciones es imposible para importantes cultivos, sobre todo de plantas tropicales que producen semillas recalcitrantes, las

que no resisten desecación y por lo tanto pueden ser almacenadas por muy poco tiempo.

2.7 CONSERVACION IN VITRO

Mediante la conservación in vitro se limita la tasa de crecimiento vegetativo con la finalidad de extender el lapso entre subcultivos.

Se han expuesto dos tipos de conservación in vitro de los bancos genéticos: a) el banco genético in vitro activo donde los cultivos se mantienen en crecimiento lento, mediante la utilización de baja temperatura, uso de osmoreguladores, retardadores del crecimiento; b) modificando la tasa de crecimiento, disminuyendo el oxígeno en el medio, cubriendo el cultivo con una capa de aceite mineral, o aplicando una baja presión parcial de oxígeno.

2.8 CRIOPRESERVACION

El principio básico para el almacenamiento de germoplasma por criopreservación consiste en la congelación del material vegetal a la temperatura del Nitrógeno Líquido. Los materiales que se pueden conservar por esta técnica incluyen ápices, yemas, meristemos, embrioides, embriones, endopermos, óvulos, anteras y semillas.

La criopreservación se basa en la reducción y subsecuentemente detención de las funciones metabólicas del material biológico, incluyendo la división celular

(Scowcroft, 1984). En consecuencia, el almacenamiento de las estructuras vivas se puede mantener por períodos indefinidos, con garantía de su estabilidad genética (Kantha, et al., 1981). La criopreservación de plantas superiores, aunque menos desarrollado que la del reino animal, ofrece técnicas muy promisorias para la conservación de germoplasma a largo plazo (Mroginski et al., 1991).

Para desarrollar un método que permita un largo tiempo de preservación del germoplasma se debe realizar estudios, en relación a:

- a) Almacenamiento de cultivos por largos períodos de tiempo en NL, pruebas de variación en los métodos de congelamiento y descongelamiento, prueba de otros agentes crioprotectores.
- b) Observación habilidad de formación de órganos de los cultivos, después de largos períodos de almacenamiento en Nitrógeno Líquido (Sugawara, y Sakai, 1974)

Sun (1958), reconoció la habilidad de recuperar tejidos vegetales después de exponerlos a ultrabajas temperaturas como la de Nitrógeno Líquido (-196°C).

Whiters (1984), reporta 42 especies que han sido criopreservadas. La criopreservación de germoplasma ha demostrado ser una buena alternativa de conservación en

especies de propagación vegetativa, entre ellas el genjibre (Zingiber officinale), mango (Mangifera indica), aguacate (Persea americana), hule (Hevea brasiliensis), caña de azúcar (Saccharum sp.)

2.8.1 Mecanismo de acción de los crioprotectores

Un importante modo de acción de los crioprotectores es la estabilización de membranas.

Los crioprotectores no penetrantes actúan por deshidratación protectora, reduciendo alrededor de la célula el contenido de agua para la formación del hielo. Los compuestos de bajo peso molecular, penetran la célula, y son considerados protectores por disminuir la temperatura a la cual el agua intracelular es congelada. Esta acción coligativa permite a la célula evitar la excesiva concentración de solutos potencialmente tóxica. Estas dos funciones primarias de los crioprotectores son de considerable importancia.

Dos crioprotectores naturales, trehalosa y prolina, se han usado con seguridad en la crioprotección de germoplasma de plantas y tejidos mamíferos. Estudios espectroscópicos muestran que trehalosa, forma puentes de hidrógeno con fosfolípidos de la membrana celular. El azúcar puede sustituir las moléculas de agua en membranas sin causar deshidratación, y de este modo conserva la integridad de las membranas. El DMSO, prolina y glicerol mantienen la

actividad AtPasa, acoplamiento, transporte unidireccional, e integridad de la membranas en el congelamiento y descongelamiento del retículo endoplasmático (Benson, 1990).

Algunos daños causados por congelamiento pueden ser lisis durante la desplasmólisis, desorganización de la membrana plasmática causada por una actividad lipoxigenasa que hace fluir material de la membrana. Las proteínas de alto peso molecular pueden reducir su peso (Bewlwy, 1973). Los cambios estructurales alteran la interacción lípidos y proteínas en las membranas y causan degradación de proteínas sensitivas al congelamiento por actividad de diversas proteasas y otras enzimas degradativas.

Se ha observado que células que recientemente han pasado por el proceso de mitosis, y en general, suspensiones en la fase exponencial de crecimiento, muestran mayor viabilidad, después del congelamiento. Células con metabolitos secundarios son menos adecuadas al congelamiento. Células jóvenes con denso citoplasma son más tolerantes al congelamiento, que células altamente vacualizadas.

Algunos compuestos como prolina y trehalosa pueden preacondicionar a las células al congelamiento por cambios en la sensibilidad de las membranas, al stress del congelamiento.

Ejemplos de antioxidantes exógenos usados en la estabilización de tejidos almacenados a bajas temperaturas, son: B-Mercaptoetilamina, Desferrioxamina, Acido urico, Mannitol, Superoxido dismutasa y Catalasa (Benson, 1990).

2.8.2 Toxidad de Crioprotectantes.

Aunque los crioprotectantes tienen un papel central en la viabilidad durante el congelamiento de las células puede también ejercer efectos tóxicos. De este modo, cuando se consideren daños por crioconservación, es también importante determinar la contribución hecha por los crioprotectores en la promoción de daños químicos.

Dos causas diferentes de toxicidad del DMSO, han sido sugeridas, osmótico y bioquímico, alterando el volumen y movimiento de agua y posiblemente interfiriendo en la glucólisis, interactuando con la enzima fructosa difosfatasa (Benson, 1990).

Kartha (1985), examinó los efectos tóxicos de crioprotectantes en la crioconservación de cultivos de plantas. Su trabajo muestra que DMSO, glycerol, ethylene glycol, y dimethylformamide, exhiben citotoxicidad en largos períodos de exposición, como en concentraciones relativamente altas, aunque en la práctica, el tiempo de contacto durante la criopreservación es relativamente poco. Algunas áreas que interesan estudiar en la aplicación de crioprotectores son uso prolongado en tratamientos de

precrecimientos, procesos de remoción, retención en la célula, metabolismo, destino y efectos a largo plazo de residuos crioprotectores después del congelamiento.

2.8.3 Etapas de proceso de la Criopreservación

Las etapas que conforman el proceso de criopreservación, de acuerdo con Withers (1983), son: a) pretratamiento, b) crioprotección, c) congelamiento, d) almacenaje, e) descongelamiento, f) pruebas de viabilidad y g) recultivo.

2.8.3.1 Pretratamiento

El precultivo del material vegetal es de gran importancia para el éxito en la fase de congelamiento. Srouty y Heshaw (1978), reportan que el uso de medios nutritivos en ápices de Solanum previo al congelamiento, mejoró el porcentaje de sobrevivencia.

En ocasiones el material vegetal se debe incubar previamente en la luz como requisito para aumentar la sobrevivencia. Otra manera de aumentar la sobrevivencia de meristemas consiste en mantener las plantas donadoras a 1-4°C por algunos días antes del congelamiento. La deshidratación parcial de las células, tejidos y órganos disminuye la posibilidad de formación de cristales de hielo y con ello aumenta la sobrevivencia.

El efecto de las temperaturas de congelamiento sobre el material vegetal depende en gran medida del genotipo de las condiciones fisiológicas del mismo, y del medio ambiente en el que se mantuvo antes del congelamiento. En general se puede decir que las características morfológicas y las condiciones fisiológicas del material vegetal antes del congelamiento influyen considerablemente a la sobrevivencia a las temperaturas ultrabajas. Las células meristemáticas pequeñas y ricas en citoplasma son más resistentes que las células más desarrolladas que presentan grandes vacuolas.

Seibert y Wetherbee (1977), aplicaron pretratamientos de 4°C por tres días, en meristemas de Dianthus caryophyllus, lo que resultó favorable a la criopreservación.

Mora (1990), logró por deshidratación de embriones cigóticos de M. acuminata ssp Burmanicoides (AA) y M. balbisiana (BB) un 74% de sobrevivencia y su posterior regeneración hasta plantas.

2.8.3.2 Crioprotección

Los materiales destinados a la criopreservación deben ser protegidos de los daños que pueden causar el congelamiento y descongelamiento, por medio de sustancias crioprotectora. Las más utilizadas son DMSO, Glicerol, azúcares, azúcares - alcoholes, aminoácidos, y polímeros de alto peso molecular (Mogriński, et al 1991).

La acción crioprotectora del glicerol fue reportada por vez primera por Polge, et al (1949), sobre células espermáticas.

Lovelock y Bishop (1954), encontró que la acción protectora del glicerol era compartida con otros solutos neutros de bajo peso molecular, incluyendo el metanol, acetamida y monoacetato de glicerol.

Whiters y King (1979), reportan que el uso de prolina como crioprotector en células de maíz, aumenta significativamente su recuperación cuando se compara con el uso de DMSO y glicerol.

Nag y Street (1975), reportaron que el DMSO y el glycerol son los más efectivos crioprotectores, estos fueron probados a 1, 2, 5, 10, 15 y 20%, con el resultado que 5% DMSO fue el más efectivo para zanahoria (Daucus carota L.) y belladona (Atropa belladona L.) y 10% glycerol para sycamore (Acer pseudoplatanus L.). Los porcentajes de sobrevivencia obtenidos en presencia de 5% DMSO, tasa de enfriamiento 2°C/min, inmersión en NL y descongelamiento en baño de agua a 37°C fue 2% para sycamore, 28% para belladona y 65% en zanahoria.

2.8.3.3 Congelamiento

El congelamiento de los materiales puede realizarse por Congelamiento rápido, Congelamiento lento y Congelamiento escalonado.

En congelamiento rápido los materiales se colocan directamente en Nitrógeno Líquido. Con este procedimiento se han crioconservado numerosas especies ápices caulinares de Solanum tuberosum; callos de Lycopersicon esculentum; meristemas de Arachis hypogaea; ápices caulinares de plántulas y semillas de Pisum sativum; suspensiones celulares de Daucus carota, e Ipomoea sp.

Durante el congelamiento lento de los materiales, la tasa de enfriamiento oscila entre el 0.1 y 3°C/min. hasta que alcanza generalmente -40°C. A esas temperaturas se produce una deshidratación celular protectora, de manera que los cristales de hielo se forman extracelularmente, luego se colocan directamente en NL.

Numerosas especies han sido criopreservadas por congelamiento lento. Entre ellas, están: Musa (AAB), Saccharum sp., Manihot esculenta, Oriza sativa, Pisum sativum, Fragaria ananasa, Daucus carota.

Cuando el congelamiento se realiza en forma escalonada, el material es sometido sucesivamente a varias temperaturas por debajo de 0°C por diferentes tiempos y luego introducidos en NL.

Callos de caña cultivados por doce días fueron enfriados 1°C/min y sometidos por 15 min a -10°C, durante dos horas a -40°C y después inmersos en NL, obteniéndose un 83.5% de sobrevivencia. Los callos fueron almacenados por seis meses en NL, después de su descongelamiento fueron capaces de regenerar plantas completas. (Chen, et al, 1987)

2.8.3.4 Descongelamiento

El descongelamiento de los materiales se puede realizar rápidamente por inmersión en baño de agua a 40°C o por simple exposición del material a la temperatura del laboratorio. Los materiales pueden también colocarse en corrientes de aire caliente o descongelar en medio de cultivo tibio cuando son estructuras desnudas. (Seibert y Wetherbee, 1977; Whitters, 1979; Mroginski, 1991).

2.8.3.5 Pruebas de Viabilidad

La viabilidad de los materiales después del congelamiento puede ser evaluado utilizando Clorhidrato de trifenil tetrazolium determinando la reducción de este compuesto por el tejido crioconservado, por la presencia de un color rojo, que indica la formación de formazán

(Sugawara, y Sakai; 1974), o por diacetato de fluoresceína, en donde solo las células vivas adquieren coloración, floreciendo en luz ultravioleta (Widholm, 1972).

Cuando el material crioconservado es meristema lo más recomendable es recultivarlos y determinar su capacidad de regenerar plantas.

2.8.3.6 Recultivo

Una vez descongelado el material vegetal debe ser recultivado; para ello se utilizan generalmente los mismos medios y condiciones en que crecía antes de su congelamiento.

2.8.4 Crioconservación de callos

Callos de muchas especies vegetales han sido crioconservadas usando diferentes pretratamientos y métodos de congelamiento.

Sugawara y Sakai (1979), criopreservaron callos de Acer pseudoplatanus L. a partir de tejido aislado del área cambial del tallo de un medio conteniendo 3 mg/l 2,4-D y 10% agua de coco. Los callos se transfirieron a un medio 6 mg/l 2,4-D, 10% leche coco, 120 rpm, 26°C y luz continua durante 3-4 semanas. Se realizaron pruebas de precongelmiento de los callos a -15, -23, -30, -40, -50, -70 durante 3 minutos, obteniendo los más altos valores en la reducción del Cloruro

trifenil - tetrazolium, cuando las células inmersas en NL fueron antes precongelados de -40 a -50°C.

Por otra parte callos de cinco mutantes de arroz fueron cultivados en presencia de un análogo sintético de Lysina, 5-aminoethyl - L - cysteina, y estudiadas su respuesta después de someterlas a congelamiento. Todas las líneas sobreviven a -196°C pero algunas son más sensitivas a bajas temperaturas (Ulrich, et al, 1982).

Callos de Triticum aestivum L. pueden ser criopreservados en de NL por lento enfriamiento (0.5°C/min), cuando se utiliza mezcla de 5% DMSO y 0.5M sacarosa por 1 hora antes del congelamiento. Las combinaciones de 5% DMSO y 0.5M sorbitol resulta ser el mejor tratamiento para sobrevivencia de callos con alto porcentaje de regeneración de plantas. Callos de trigo almacenados en NL pueden producir plantas normales cuando son recultivados. Lesiones específicas originadas durante el congelamiento afectan la regeneración del vástago y raíces (Chen et al, 1985).

Cultivos de callos de Lotus corniculatus L. mostraron máxima tolerancia al frío cuando se cultivaron en medio con 10^{-5} molar ABA, y 24°C. Esas condiciones de crecimiento le proporcionan aclimatación mínima para el stress por congelamiento. (Keith y MacKensie, 1986).

Chen, et al (1987), crioconservaron callos de Saccharum sp. obtenidos de explantes de hojas cultivados en medio sólido conteniendo 2 mg/l de 2,4-D. La crioprotección de los callos con 10% DMSO y 0.5 M sorbitol, resultó adecuada para la crioconservación de los callos.

2.8.5 Crioconservación de Suspensiones Celulares.

Latta (1971), desarrolló e un método de preservación de cultivo de suspensiones celulares de Daucus carota L.. Estas fueron cultivadas en un medio convencional con 20 gr/l sacarosa y sobrevivieron al congelamientos a -40 y -196°C en presencia de agentes protectores.

Finkle y Ulrich (1979), trabajaron con suspensiones celulares de Saccharum, cultivada en un medio M.S más 3 mg/l 2,4-D y 10% agua coco; la tasa de enfriamiento utilizada fué de -10°C/2 min y las suspensiones fueron sometidas por 4 minutos a temperatura de -10; -15; -23; -40°C y -196°C; el descongelamiento se realizó por inmersión del criotubo a un baño de agua a 40°C. Estos autores determinaron que 8% y 12% de glucosa y DMSO respectivamente fueron los mejores tratamientos crioprotectores.

Suspensiones celulares de zanahoria (Daucus carota L.) se han criopreservado por lento congelamiento de aproximadamente 2°C/min, en medio, conteniendo DMSO como crioprotector. Después de su almacenamiento en NL y

descongelamiento, se determinó su alta viabilidad y capacidad de crecimiento. (Withers, 1979)

Células de Catharanthus roseus (L.) y subcultivos de suspensiones fueron almacenados durante 11 semanas en NL, descongelados y recultivados. La máxima sobrevivencia se obtuvo cuando las células fueron precultivadas por 24h en medios nutritivos con 5% DMSO con una tasa de enfriamiento previo al congelamiento de 0.5 1°C/min (Kantha, et al., 1982).

Suspensiones de células de Medicago sativa L. tratadas con 5×10^{-5} M ABA a 2°C durante cuatro semanas en ausencia de kinetina mostró un 50% sobrevivencia después de su enfriamiento a -12.5°C, cuando los cultivos crecieron a 25°C en condiciones normales, únicamente toleró el enfriamiento hasta -3°C (Orr, et al., 1985).

Suspensiones de células de trigo pueden ser inducidas a mayor tolerancia al congelamiento cuando se emplea ABA, bajas temperaturas, o la combinación de ambas (Keith, Mc Kenzie, 1986).

Pritchard (et al., 1986), sometieron a stress osmótico con 6% de manitol o sorbitol a suspensiones celulares de sycamore y soya. Los efectos en crecimiento, se observaron en la reducción del número de células y producción de biomasa. Las células de sycamore en la fase exponencial de crecimiento, exhibió incremento en la actividad respiratoria

y contenido de proteínas solubles y se observó disminución en la cantidad de prolina libre.

Conanapragasann y Vasil (1990), obtuvieron regeneración de plantas a partir de suspensión de células de caña de azúcar criopreservadas y establecidas a partir de callos derivados de hojas. El medio de crecimiento fue suplementado con 0.3M de sorbitol.

La tasa de enfriamiento utilizada fue de 0.5°C/min hasta -40 y almacenado en nitrógeno líquido; el descongelamiento se realizó a 40°C. Las plantas regeneradas a partir de células criopreservadas fueron morfológicamente idénticas a plantas control regeneradas.

Cultivo de células de Lavandula vera fueron criopreservadas en presencia de sulfóxido de dimetil y D-glucosa. La adición de carbón activado en el medio de cultivo de recuperación reduce la viabilidad después del congelamiento e incrementa la formación de colonias en las células. (Kuriyama, et al, 1990).

Panis, et al (1990). Lograron criopreservar suspensiones celulares de Musa (ABB). Estos autores determinaron que el tratamiento crioprotector más efectivo fue DMSO 5% cuando la tasa de enfriamiento fue utilizada de 1°C/min hasta - 40°C, seguido de la posterior introducción en NL. Después de el congelamiento de la suspensión, esta

tuvo capacidad de regenerar embriones somáticos los cuales desarrollaron plantas normales.

Suspensión de células cultivadas de callos de nucela de (Citrus sinensis Obs. var. brasiliensis Tanaxa) fueron criopreservadas. Las células se crioprotegieron usando en el medio 5% DMSO + 1.2M Sacarosa en baño de hielo por 1 hora, seguido de enfriamiento a una tasa de 0.5°C/min hasta -40°C, y su posterior inmersión en Nitrógeno Líquido. La viabilidad después del congelamiento fue de un 70% respecto al control. Las plantas regeneradas a partir de células criopreservadas fueron morfológicamente uniforme y tenían las características similares a las del control. (Sakai, Sugawara, 1973).

2.8.6 Crioconservación de embriones

Embriones somáticos obtenidos de explantes de hoja de Coffea arabica sobreviven después de congelados en NL. Los embriones se cultivaron por 24h en medio con 0.75M sacarosa, y DMSO al 5% por 2h, preenfriados a -40°C y luego introducidos en NL, la recuperación del material después del descongelamiento fue de 50% (Bertrand, et al., 1988)

Bajaj (1984), logró regeneración de raíces y plántulas a partir de embriones de polen y embriones cigóticos de trigo y arroz congelados a -196°C, y recultivados en MS + 2.4-D (0.5 mg/l) por seis y diez semanas.

Engelman et al (1988), desarrolló la técnica de crioconservación de embriones somáticos de palma y hule. Similares resultados obtuvo en embrioides almacenados por 15 meses en NL, las plántulas obtenidas después de la crioconservación mostraron ser normales.

Embriones somáticos obtenidos de explantes de hoja de C. arabica sobreviven después del congelamiento, cuando fueron precultivados en medios enriquecidos con 0.75M sacarosa e incubados en medio con 5% DMSO, después de 2 horas fueron enfriados a -40°C y posteriormente introducidos en NL. Las primeras plantas obtenidas a partir del material congelado y posterior crecimiento *in vitro* tuvieron un normal desarrollo (Bertrand, et al, 1988).

Un método de criopreservación ha sido desarrollado usando diferentes estados de desarrollo p.e. multiplicación de embrioides y estructuras embriogénicas de palma de aceite (Eleais guineensis). Después que clones fueron sometidos por 7 a 15 meses en Nitrógeno Líquido se obtuvo formación de embrioides. (Engelman et al, 1988).

Engelmann y Dereudore (1988), criopreservaron embriones somáticos de palma de aceite usando congelamiento rápido ($200^{\circ}\text{C min}^{-1}$) y por congelamiento programable de -20°C hasta -100°C con tasas de enfriamiento entre 0.5 y $40^{\circ}\text{C min}^{-1}$ seguido de inmersión en Nitrógeno Líquido.

Uragami, et al (1989), cultivaron células y embriones somáticos derivados de tejido mesofilico de Asparagus officinalis L. los que criopreservó por vitrificación. La solución vitrificadora contenía 22% glicerol, 15% de ethilen glicol, 15% propilen glicol y 7% DMSO en medio MS enriquecido con 0.5M Sorbitol. Los embriones sobrevivientes posterior al congelamiento desarrollaron plántulas.

2.8.7 Crioconservación de protoplastos

El pretratamiento de células de Brassica campestris con 1.5M etilen-glicol minimisa daño por deshidratación durante la transferencia a una solución vitrificadora concentrada y facilita la vitrificación de las células durante el congelamiento en NL. De esta forma se obtiene sopresar un 40% de sobrevivencia basado en la reducción del Cloruro trifenil de tetrazolium (TTC) (Langis et al, 1989).

Langis y Steponkus (1990), desarrollaron un procedimiento para la vitrificación de protoplastos del mesófilo de hojas de Secale cereale L. El procedimiento implica, a) tratamientos de protoplastos mediante concentraciones de 1.5 - 1.75 - 2.0 M de etilen-glicol (EG) b) deshidratación de protoplastos en 0.7M EG + 0.88 M sorbitol + 6% de suero de albumina de bovino, c) introducción en NL; d) recuperación de protoplastos de NL y remoción de la solución vitrificadora. La sobrevivencia obtenida de los protoplastos varió de 34-47%.

2.8.8 Crioconservación de semillas

Grout, et al (1983). Encontraron que semillas de Eleais guinensis muestran carácter ortodoxo, y no recalcitrante. La recuperación de la viabilidad de embriones expuestos a NL y el subsecuente recrecimiento in vitro, muestran ser una técnica práctica para la conservación por largos períodos de los recursos genéticos de esta especie.

Marin, et al (1990), obtuvieron, cerca del 97% de sobrevivencia de embriones cigóticos y semillas enteras de Manihot esculenta, por medio de métodos de enfriamiento lento y rápido, seguido de lento descongelamiento.

2.8.9 Criopreservación de polen

El pólen de tomate es capaz de mantener su viabilidad después de ser congelado y almacenado en Nitrógeno Líquido por doce meses, cuando es deshidratado antes del congelamiento, y el contenido de agua es de 5.2% puede ser almacenado con seguridad (Manzhulin, A.V.; Yashina, I.M., 1976). También se ha estudiado la viabilidad de pólen y fertilidad en 10 variedades de tomate, después de un almacenamiento prolongado en NL. El almacenamiento no mostró efectos adversos en el pólen (Manzhulin, A.V.; Shamakova, L.I.; Sklyarova, N., 1984)

También se ha determinado porcentaje de germinación de pólen de cinco cultivares de Vitis vinifera mantenidos in vitro, después de 4, 26, ó 64 semanas de almacenamiento en Nitrógeno Líquido, observándose diferencias en los porcentajes de germinación antes y después del almacenamiento (Ganeshan, S.; 1985).

Tisserat, et al (1985), evaluaron la viabilidad del pólen de palma, cuando fue almacenado por una hora y descongelando a temperatura ambiente. Pruebas de polinización con pólen congelado y no congelado resultaron ser similares.

2.8.10 Criopreservación de otras estructuras

Haskins et al (1980), reportaron la criopreservación de meristemas de pera después de ser crioprotegidos con DMSO, y fueron capaces de mostrar crecimiento posterior al descongelamiento.

También se han criopreservados meristemas de Arachis hypogaea, usando una mezcla crioprotectora de glicerol 5%, DMSO 5% y sacarosa 5% (Bajaj, 1979). Meristemas de Pisum sativum tratados con DMSO 5% han sido criopreservados con un 60-65% de viabilidad (Sala, et al, 1979).

De igual modo meristemas de Manihot esculenta han sido criopreservados por Kartha et al (1982) mediante el empleo de DMSO al 15% y sacarosa 3% (Kartha, 1982).

Henshaw, et al (1980), criopreservó ápices caulinares de Salanum tuberosum con DMSO 10%, con el resultado que el 60% sobreviven al congelamiento.

Se reporta de igual modo la criopreservación de yemas de Morus bombycis Kidz, los que después del congelamiento fueron recultivados en una medio con 1 mg/l de Benzyladenina, regenerando plantas (Yakuwa, Oka, 1988).

El método de crioconservación sin duda ha sido evaluado en un gran número de especies vegetales y en todo tipo de cultivos, meristemos, callos, embriones, etc. lo que indica que el método es de gran valor para la conservación de colecciones base a largo plazo.

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Crioconservación de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE de Octubre de 1990 a Septiembre de 1991.

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado en la presente investigación consistió de plantas de Musa cultivadas *in vitro* de cultivar comercial Gran Enano (AAA). Además, se utilizaron callos embrigénicos de Musa acuminata spp. Malaccensis que fueron donados por Dr. Vincent Escalant.

3.2 INDUCCION DE CALLOS

Callos embriogénicos de Musa acuminata spp. Malaccensis fueron obtenidos en un medio de Murashige y Skoog (1962) con M.S. (1962) con 2 mg/l Picloram y mantenidos y multiplicados en M.S. 0.5 y 2 mg/l de Picloram (Escalant, 1989).

Para la inducción de callos Gran Enano, secciones de hojas y tejidos subapicales de los cultivares Gran Enano (AAA) y Curraré (AAB) fueron inoculados en medio básico descrito Murashige y Skoog (1962), los que fueron suplementados con 100mg/l de Myo-inositol y diferentes concentraciones de auxinas. El ácido indolacético (AIA), ácido naftaleno acético (ANA) y el ácido 2,4,

diclorofenoxiacético (2,4-D) fueron evaluados a 2 y 4 mg/l. El Picloram fue evaluado a 1, 2 y 3 mg/l. Se realizaron también combinaciones de Picloram 2 y 4 mg/l con 0.021, 0.06 y 4.58 mg/l de Cinetina.

En Gran Enano se realizaron pruebas de combinaciones de Picloram y Zeatina, 2 y 4 mg/l de Picloram fueron combinadas 0, 1.096 y 2.192 mg l^{-1} de zeatina. También se utilizaron combinaciones de Picloram y Cinetina en las siguientes proporciones 1:1; 1:2; 1:3; 2:1; 2:2; 2:3; 3:1; 3:2; y 3:3; mg/l respectivamente para la inducción de callos.

3.3 PREPARACION PARA EL CONGELAMIENTO DE CALLOS DIPLOIDES.

Musa acuminata

Como pretratamiento los callos embriogénicos de Musa acuminata (AA) de tres meses de edad fueron cultivados en MS (1962) suplementado con 2 mg/l de Picloram, al cual se adicionó sacarosa a 0.5 M y 0.75 M. Los callos fueron incubados por periodos de 24, 48 y 72 horas (Ver Cuadro 1). Al final de este periodo, los callos fueron colocados en medio líquido a 5°C conteniendo 5% DMSO por 1 hora. Luego los callos fueron transferidos a criotubos de polipropileno de 2 ml de capacidad.

Para el congelamiento, los criotubos conteniendo los callos, fueron inmersos en Nitrógeno Líquido (NL) rápidamente durante 2 horas. El descongelamiento se realizó en un baño de agua a 40°C por 1 minuto. Para su

recuperación los callos fueron colocados en el medio de mantenimiento.

CUADRO 1. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN EL CONGELAMIENTO RAPIDO DE CALLOS DIPLOIDES de Musa acuminata ssp. Malaccensis.

SACAROSA (M)	TIEMPO (Horas)			DMSO (%)	
0.5	24	48	72	0	5
0.75	24	48	72	0	5

Callos de M. acuminata fueron también criopreservados por medio del congelamiento lento. Se utilizó un congelador programable Cryo-Med modelo 1010. El congelamiento se realizó de la siguiente manera: una tasa inicial de enfriamiento de 1°C/min. hasta -4°C, seguida de 30°C/min. hasta -32°C; luego se calentó para inducir cristalización a una tasa de 15°C/min. hasta -8°C y finalmente se continuó el congelamiento a 1°C/min hasta -40°C.

Cuando se alcanzó la temperatura de -40°C se introdujo la muestra en NL. El descongelamiento y la recuperación se efectuaron de la manera descrita anteriormente.

3.4 CONGELAMIENTO CALLOS GRAN ENANO

El congelamiento de callos (AAA) de Gran Enano se realizó, en forma lenta con dos diferentes tasas iniciales de enfriamiento y rápidamente por inmersión directa en NL.

Al igual que para los callos embriogénicos del diploide se emplearon diferentes concentraciones de sacarosa, DMSO, tiempo de incubación y tasas iniciales de enfriamiento en un congelador programable.

En pruebas de congelamiento directo de NL se emplearon pretratamientos de 0.5 y 0.75 M de sacarosa por periodos de exposición que variaron de 24, 48 y 72 horas. Estos mismos pretratamientos fueron evaluados utilizando DMSO 5% como sustancia crioprotectora.

Dos programas de preenfriamiento fueron evaluados en el congelamiento lento de callos (AAA) de Musa Gran Enano. Las tasas iniciales de enfriamiento fueron de 0.5 y 1.0°C/min, hasta alcanzar una temperatura de -4°C, en cada uno de los programas se continuó con tasas de enfriamientos de 30°C/min, hasta alcanzar la temperatura de -32°C, luego 15°C/min, hasta alcanzar -8°C y finalmente 1°C/min hasta -40°C.

Los pretatamientos evaluados fueron sacarosa 0.5 y 0.75 M. Estas mismas concentraciones de sacarosa se evaluaron cuando se usó DMSO al 5% como crioprotector.

3.5 Análisis de sobrevivencia.

Para determinar la sobrevivencia de los callos posterior al congelamiento, diploides como para los triploides, se realizaron pruebas de viabilidad utilizando cloruro trifenil tetrazolium 0.8% en Solución Buffer 8.9 g/litro de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ y 6.8 g/litro de KH_2PO_4 (Kantha, 1982). También se determinó su capacidad de crecimiento en el medio de mantenimiento. MS (1962) similar en el que se realizó la producción de callos.

3.6 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis de Ji Cuadrado determina si hay alguna relación entre dos criterios de clasificación o si son completamente independientes. Para tal efecto se estudian las muestras de tamaño n de la población y se estudia las dos variables bajo la hipótesis nula que hay independencia entre ambas. Si la hipótesis nula no es cierta, se dice que hay interacción entre los dos criterios de clasificación.

IV. RESULTADOS

4.1 PRODUCCION DE CALLOS

Los intentos de producción de callos utilizando como explantes hojas y tejidos subapical de plántula in vitro de los cultivares Gran Enano y Curraré fueron negativos cuando se empleó AIA, ANA y 2,4-D a 2 y 4 mg/l respectivamente. La respuesta fue la misma cuando se empleó Picloram a 1, 2, 3 mg/l.

El cultivo de tejidos subapicales de Gran Enano en el medio suplementado con Picloram y Cinetina, dio como resultado la formación de callos después de un mes de cultivo cuando las concentraciones usadas fueron de 2 mg/l Picloram y 0.06 mg/l Cinetina, lográndose un 20% de producción. Las mismas concentraciones se emplearon para Tejidos subapical de Curraré, obteniéndose 15% de producción de callos en la misma combinación que resultó favorable para Musa Gran Enano.

Cuando se emplearon combinaciones de Picloram y Zeatina (2 y 1.096 ,mg/l) respectivamente y (2 y 2.192 mg/l) en tejidos subapicales de Gran Enano se observó la formación de callos en porcentajes de 25% y 10% respectivamente. En Curraré sin embargo, únicamente se observó un 5% de formación de callos cuando se empleó 2 mg/l Picloram y 1.096 mg/l zeatina.

El mayor porcentaje de formación de callos de cultivos de Tejido subapical de Gran Enano se logró con 1 mg/l Picloram y 1 mg/l Cinetina, en este caso un 80% de los cultivos formó callos. Cuando la Cinetina se aumentó a 2 mg/l y se mantuvo la concentración de Picloram a 1 mg/l el porcentaje de formación de callos de los cultivos de tejidos subapicales de Gran Enano se redujo a 15%.

Las mismas combinaciones de Picloram y Cinetina fueron utilizadas en Tejidos subapical de Curraré, lográndose únicamente un 8% de producción de callos de los cultivos cuando se combinó Picloram y cinetina a 1 mg/l cada uno. Ver Cuadro 2 y 3.

CUADRO 2. FORMACION DE CALLOS A PARTIR DE TEJIDO SUBAPICAL DE GRAN ENANO EXPRESADO EN PORCENTAJE.

PICLORAM mg/l	CINETINA (mg/l)		
	1	2	3
1	80	15	-
2	-	-	-
3	-	-	-

CUADRO 3. INDUCCION DE CALLOS EN TEJIDOS SUBAPICAL DE CURRARE EXPRESADO EN PORCENTAJE.

PICLORAN mg/l	CINETINA (mg/l)		
	1	2	3
1	8	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-

Aunque algunos ensayos realizados para la inducción de callos en tejidos de Musa Curraré, mostraron producción de callos, su producción fue muy baja en relación a Gran Enano, por tal razón no se dispuso de la cantidad necesaria de callos para realizar las pruebas de criopreservación.

Los callos formados a partir de tejidos subapicales de Gran Enano se caracterizaron por ser de calor blanquesino y muy frágiles. En ningún caso se logró obtener callos a partir de explantes de hoja de Gran Enano y Curraré.

4.2 CRIOCONSERVACION DE CALLOS

4.2.1 Crioconservación de callos de Musa acuminata spp Malaccensis (AA)

Callos embriogénicos de genotipo diploide de tres meses de edad, fueron sometidos a pretratamiento con diferentes concentraciones de Sacarosa y DMSO fueron congelados en NL y posteriormente evaluados mediante la prueba de la reducción del cloruro de Trifenil tetrazolium (TTC) para determinar su

viabilidad después de ser sometido a congelamiento rápido. La mayor viabilidad de los callos se obtuvo cuando estos fueron pretratados con 0.5M Sacarosa por 24h, el porcentaje de sobrevivencia en este caso fue de 80%, disminuyéndose a 75% y 35% cuando el pretratamiento se prolongó a 48 h y 72 h respectivamente. Ver Cuadro 4.

CUADRO 4. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE CALLOS EMBRIOGENICOS, DE Musa acuminata ssp Malaccensis. UTILIZANDO DMSO Y SACAROSA.

SACAROSA	TIEMPO	DMSO	CONGELAMIENTO	SOBREVIVENCIA (%)
0.5 M	24 h	0%	NL	80
	24 h	5%	NL	0
0.5 M	48 h	0%	NL	75
	48 h	5%	NL	0
0.5 M	72 h	0%	NL	35
	72 h	5%	NL	0
0.75 M	24 h	0%	NL	20
	24 h	5%	NL	-
0.75 M	48 h	0%	NL	32
	48 h	5%	NL	0
0.75 M	72 h	0%	NL	0
	72 h	5%	NL	0
0.1 M	0	0%	NL	0
	0	5%	-	0 100% 100%

El análisis de Ji cuadrado (χ^2), realizado para establecer diferencias significativas entre el porcentaje de

sobrevivencia de callos cuando los tratamientos utilizados fue de -24 h son 0.5M sacarosa, DMSO (0%) y 48 h 0.5M sacarosa y DMSO (0%), indican que no existe diferencia significativa en el porcentaje de sobrevivencia obtenida cuando se aplican esos tratamientos, con un nivel de significancia de 0.05. El análisis se realizó sobre el número de observaciones.

Los mismos pretratamientos fueron evaluados utilizando un sistema de enfriamiento lento mediante un congelador programable, seguido de la introducción de los materiales en NL, el mayor porcentaje de sobrevivencia se obtuvo a 0.5M Sacarosa por 24h con 65%, seguido de 0.5M Sacarosa por 48h con 40% de sobrevivencia. El análisis Ji cuadrado (χ^2) realizado sobre número de observaciones (n) indica diferencias significativas con 1 grado de libertad y con un nivel de significancia de 0.05 en los porcentajes de sobrevivencias obtenidos entre los tratamientos 0.5M sacarosa por 24h y 0.5M sacarosa por 48h. Cuando los materiales pretratados a 0.5M Sacarosa por 24h se le adicionó 5% DMSO la sobrevivencia disminuyó a 20%. En los otros pretratamientos evaluados la sobrevivencia fue siempre de 0% como lo indica el Cuadro 5.

CUADRO 5. PREENFRIAMIENTO Y CONGELACION DE CALLOS EMBRIOGENICOS DE Musa acuminata ssp. Malaccensis.

SACAROSA	TIEMPO	DMSO	CONGELAMIENTO	SOBREVIVENCIA (%)
0.5 M	24 h	0%	-40,-196	65
	24 h	5%	-40,-196	20
	48 h	0%	-40,-196	40
	48 h	5%	-40,-196	0
	72 h	0%	-40,-196	0%
	72 h	5%	-40,-196	0
0.75 M	24 h	0%	-40,-196	0
	24 h	5%	-40,-196	0
	48 h	0%	-40,-196	0
	48 h	5%	-40,-196	0
	72 h	0%	-40,-196	0
	72 h	5%	-40,-196	0

4.2.2 CRIOCONSERVACION DE CALLOS DE GRAN ENANO

El congelamiento directo de callos de Gran Enano pretratados con 0.5 y 0.75 M de Sacarosa, mostró una mayor respuesta de sobrevivencia a 0.5M por 72h. Los mismos pretratamientos que se observan en el Cuadro 6 fueron combinados con 5% DMSO, obteniéndose 0% de respuesta a la sobrevivencia en todos los casos.

CUADRO 6. CONGELAMIENTO RAPIDO EN NITROGENO LIQUIDO DE CALLOS DE GRAN ENANO.

SACAROSA	TIEMPO (horas)	CONGELAMIENTO	SOBREVIVENCIA (%)
0.5 M	24	NL	20
	48	NL	20
	72	NL	75
0.75 M	24	NL	50
	48	NL	0
	72	NL	0

Callos de Gran Enano pretratados con Sacarosa a 0.5M, y 0.75M y 5% DMSO fueron preenfriados hasta -40°C, y posteriormente introducidos en NL. Los mejores resultados se obtuvieron a 0.5M Sacarosa por 24h y 5% DMSO con 80% de sobrevivencia y a 0.5M sacarosa por 48h y 5% DMSO con 75%. El análisis de χ^2 sobre el número de muestras (n) de estos tratamientos no muestran diferencias significativas en el valor del porcentaje de sobrevivencia obtenida, los resultados de los otros tratamientos pueden observarse en el Cuadro 7.

CUADRO 7. ENSAYO CONGELAMIENTO GRAN ENANO, TASA DE ENFRIAMIENTO INICIAL 1°C/min.

SACAROSA	TIEMPO	DMSO	CONGELAMIENTO	SOBREVIVENCIA (%)
0.5 M	24 h	5%	-40,-196	80
	24 h	5%	-196	0
	24 h	5%	-40	90
	48 h	5%	-196	0
	48 h	5%	-40	100
	48 h	5%	-40,-196	75
0.75 M	24 h	5%	-40,-196	0
	24 h	5%	-196	0
	24 h	5%	-40	0
	48 h	5%	-40,-196	20
	48 h	5%	-196	0
	48 h	5%	-40	50

En callos pretratados con 0.5 y 0.75M Sacarosa, se utilizaron tasas iniciales de preenfriamiento de 0.5°C y 1°C/min, se alcanzó 50% sobrevivencia con 0.75M durante 24h y aumentó hasta 80% cuando la exposición en sacarosa fue de

48h. En los demás casos la sobrevivencia fue 0%, como se observa en el Cuadro 8.

CUADRO 8. ENSAYOS GRAN ENANO TASA INICIAL DE ENFRIAMIENTO 0.5°C/m Y 1°C/min.

SACAROSA	TIEMPO	CONGELAMIENTO	SOBREVIVENCIA	
			0.5°C/min	1°C/min
0.5	24 h	-40,-196	0	0
0.5	48 h	-40,-196	0	0
0.75	24 h	-40,-196	50	0
0.75	48 h	-40,-196	80	0

Los intentos de regeneración a partir de callos de Gran Enano no fue posible. Los callos utilizados en estas pruebas, fueron los que mostraron crecimiento después del congelamiento. Las pruebas realizadas en medio de MS (1962) suplementado con Picloram 0.5 y 1.0 mg/l y Zeatina 0.5 y 1.0 mg/l, no estimularon la regeneración. Igualmente se realizaron pruebas con BAP 2-4-6 mg/l.

Los callos embriogénicos de Musa acuminata que mostraron mejor crecimiento, fueron los tratados con 0.5M Sacarosa por 24 horas e inmersión directa en NL y por preenfriamiento hasta -40, y posterior inmersión en NL.

En callos de Gran Enano el mejor crecimiento se observó a 0.75 M Sacarosa por 48h, preenfriado a -40°C y posterior inmersión en NL.

V. DISCUSION

5.1 PRODUCCION DE CALLOS

Los resultados obtenidos en la producción de callos, para crioconservación, utilizando explantes de tejidos subapical de plántulas *in vitro* de los cultivares Gran Enano, indican que, la sola presencia de auxinas como reguladores de crecimiento, no favorecen la producción de callos. Sin embargo Chen, *et al* (1987), logró la producción de callos utilizando como reguladores el 2,4-D como fuente auxínica, a partir de explantes de hoja de caña de azúcar. En nuestro estudio se pudo observar que ocurre cierto estímulo en la producción de callos cuando hay combinación de reguladores de crecimiento, 2 mg/l Picloram, Cinetina 0.06 mg/l; no obstante los porcentajes de producción resultaron relativamente bajos, 15% en Tejidos Subapical de Curraré y 20% para Gran Enano.

Las combinaciones de Picloram y Zeatina que resultaron ser mejores en la estimulación de callos fue a 2 mg/l Picloram y Zeatina 1.09 mg/l, sin embargo esto solo produjo que un 25% de los explantes produjeran callo, se observó que el aumentar la concentración de zeatina a 2.192 mg/l, se produjo un descenso en el número de callos producidos. Los explantes de tejido subapicales de Curraré mostraron una respuesta diferente a estas condiciones de cultivo, lográndose únicamente que un 5% de los explantes incubados a

2 mg/l Picloram y Zeatina 1.096 produjeran callo. Esto nos indica, que la respuesta es también dependiente del genotipo utilizado.

La mayor producción de callo se obtuvo cuando el Picloram fue combinado con Cinetina 1:1 mg/l, la respuesta de formación de callo alcanzó un 80% en Tejidos subapicales de Gran Enano, un incremento en las proporciones de Picloram y Cinetina no resultó beneficioso en la producción de callos, los reguladores de crecimiento auxina y cinetina, después de alcanzar el valor óptimo que promueve el crecimiento, produce efectos inhibitorios. Es posible que al incrementar las concentraciones de estos reguladores en el medio de cultivo, se produzca un efecto inhibitorio sobre los tejidos, impidiendo la producción de callos.

Mater (1987), logró inducir callos en ápices de vástagos de palma en medios de cultivos enriquecidos con 2,4-D a 10 mg/l. Igualmente Bajaj (1985), mediante el empleo de 2,4-D logró obtener callos de explantes de embriones inmaduros de Triticum aestivum.

A pesar que las anteriores investigaciones lograron la producción de callos destinados a crioconservación mediante la estimulación auxinica; para callos de Gran Enano es necesario el empleo de fuente de auxina y citocininas.

Sugawara y Sakai (1974), reportan la utilización de 2,4-D; 3 mg/l en combinación con 10% de agua de coco como fuente de citocinina.

5.2 CRIOCONSERVACION DE CALLOS

Los resultados de pretratamientos con sacarosa y DMSO de callos embriogénicos diploides indican que el pretratamiento con 0.5M sacarosa durante 24h es el más adecuado para el congelamiento rápido de estos callos en Nitrógeno Líquido (NL). La aplicación de DMSO a callos pretratados con Sacarosa en ningún caso resultó provechoso.

Este resultado difiere con el encontrado por Jian, et al (1987), quienes reportan que las condiciones óptimas para criopreservar callos de caña se presentan cuando se usa 10% DMSO + 0.5M de sorbitol como crioprotectores.

Cuando los callos se sometieron a pretratamiento con mayor concentración de sacarosa y por mayor tiempo de exposición, no se obtuvo ningún porcentaje de sobrevivencia, al ser evaluadas con cloruro de trifenil tetrazolium (TTC).

Trabajos realizados en crioconservación de callos de Saccharum sp., determinaron 10% DMSO + 10% polietilen glicol + 8% glucosa es la más efectiva mezcla crioprotectora en callos, (Ulrich, 1979); esta misma mezcla crioprotectora se reporta por Finkle et al (1984), para crioproteger callos de Medicago sativa.

Cuando los callos embriogénicos de Musa acuminata (AA) diploides fueron congelados lentamente hasta -40, con tasa de enfriamiento 1°C/min y luego introducidos en NL, mostraron el mayor porcentaje de sobrevivencia se obtuvo al igual que en congelamiento rápido, cuando estos fueron pretratados por 24h en 0.5M Sacarosa.

En ambos ensayos de congelamiento, se muestra el efecto adverso que causa un posible exceso en la deshidratación del tejido, ocasionada por las concentraciones crecientes de sacarosa y mayor período de exposición, esto ocasiona una excesiva concentración de solutos potencialmente tóxica, que impide que los callos sobrevivan después del congelamiento.

Cuando el período de exposición de callos es de 24 h en 0.5M de Sacarosa es posible que la deshidratación producida sea de carácter protector y el azúcar puede sustituir moléculas de agua en la membrana, conservando la integridad de las membranas, que permite al tejido sobrevivir después de su congelamiento en NL.

El uso del DMSO como agente crioprotector no resultó provechoso en ningún caso en que los callos de Musa acuminata fueron congelados de forma rápida. Únicamente se obtuvo 20% de sobrevivencia de estos cuando fueron congelados lentamente y pretratados con 5% DMSO combinado con períodos de exposición de los callos de 24 h en 0.5M Sacarosa. El congelamiento lento produce una deshidratación

celular protectora, de manera que los cristales de hielo se forman extracelularmente, (Mogrinski, 1991) esto posiblemente explica porqué DMSO 5% en congelamiento lento produce un 20% de sobrevivencia.

El posible efecto tóxico que el DMSO realizó sobre los callos puede ser ocasionado por la alteración de el volumen y el movimiento del agua en los tejidos, y posiblemente interfiera en la Glucólisis, interactuando con la enzima difosfatosasa (Benson, 1990).

Callos de caña de azúcar se han criopreservado con tasa inicial de enfriamiento 1°C/min hasta -40°C y luego introducidos en NL. Después de seis meses de congelamiento en NL, el 90% de los callos logró sobrevivir (Jian, et al, 1987).

Las pruebas realizadas utilizando DMSO por 24 y 48h de exposición, en ausencia de sacarosa y congelamiento rápido mostró 0 y 50% respectivamente de sobrevivencia de los callos M. acuminata. La mezcla de sacarosa y DMSO no resultó efectiva en ningún caso. Sin embargo DMSO en combinaciones con otros crioprotectores como Polietilen glicol, sorbitol, glucosa podrían resultar beneficiosas. Ulrich, 1979; Finkle et al, 1984, reportan mezclas de DMSO, Polietilen glicol y glucosa como efectivas en la crioconservación de callos de caña de azúcar.

5.3 CRIOCONSERVACION DE CALLOS DE GRAN ENANO

Los resultados obtenidos en los ensayos de pretratamientos de callos de Gran Enano, muestran que 0.5M sacarosa durante 72h, resulta ser efectivo para lograr 75% de sobrevivencia de estos callos cuando son congelados rápidamente en NL.

Estos resultados a diferencia de los obtenidos en Musa acuminata ssp. Malaccensis muestran que, requieren un mayor período de exposición de los callos en sacarosa. El 75% de sobrevivencia se obtiene cuando los callos están durante 72 h en 0.5M de Sacarosa. Debido a la fragilidad de los callos de Musa Gran Enano estos requieren una mayor deshidratación que les permite garantizar la estabilidad de sus membranas durante el período de congelamiento y descongelamiento.

Cuando se realizó congelamiento lento de callos de Gran Enano, la combinación de 5% DMSO con 0.5M Sacarosa por 24 y 48h resultó adecuada para el congelamiento de los callos, debido que este procedimiento permite una deshidratación celular protectora. Sin embargo una excesiva deshidratación, cuando fueron expuestos a 0.75M Sacarosa, provocó daños celulares que ocasionó la pérdida de la capacidad de sobrevivencia después del congelamiento de los callos. Esos daños pueden ser la desorganización de la membrana plasmática y degradación de proteínas sensibles al congelamiento (Bewlwy, 1973).

Callos de Gran Enano, en ausencia de DMSO y con pretratamientos de Sacarosa 0.5 - 0.75M por 24 y 48h, fueron sometidos a congelamiento lento con una tasa de enfriamiento de 1°C/min hasta -40; temperatura a la cual la mayor parte del agua ha sido congelada extracelularmente y posteriormente introducidos en NL; no logrando que sobreviviera después del congelamiento ninguno de los callos. A diferencia cuando la tasa de enfriamiento se disminuyó a 0.5°C/min se logró obtener un 50% de sobrevivencia con pretratamientos de 0.75M Sacarosa por 24h y aumentar hasta 80% cuando el período de exposición a la misma concentración fue de 48h.

Los callos de Musa acuminata ssp. Malaccensis y Gran Enano que resultaron viables después del congelamiento fueron recultivadas, manteniendo estos su capacidad de crecimiento en forma de callos.

Los callos de Gran Enano que mostraron mejor crecimiento fueron los pretratados con 0.75M Sacarosa por 48h, congelados lentamente a 0.5°C/min, los callos de Gran Enano congelados rápidamente, no mostraron crecimiento después de ser recultivados.

VI. CONCLUSIONES

1. La mayor producción de callo en tejidos subapical de Gran Enano se obtiene cuando al medio de cultivo se le adiciona 1 mg/l Picloram; 1 mg/l de Cinetina.
2. La mayor viabilidad de callos embriogénicos diploides se obtiene cuando estos son pretratados con Sacarosa 0.5M por 24 horas y sometidos a congelamiento rápido en Nitrógeno Líquido (NL).
3. El congelamiento lento de callos embriogénicos fue igualmente efectivo que en el congelamiento cuando los callos fueron pretratados con 0.5M sacarosa por 24h.
4. La exposición de callos embriogénicos en DMSO 5% por 48h, previo a su congelación directa permitió un 50% sobrevivencia.
5. En callos de Gran Enano, pretratados con 0.5M Sacarosa por 72 h se logra un 75% de sobrevivencia, después del congelamiento rápido en NL.
6. Combinaciones de DMSO 5% con 0.5M Sacarosa por 24h resultó efectivo para congelamiento lento de callos de Gran Enano con tasa inicial de enfriamiento 1°C/min. La sobrevivencia después de el almacenamiento en NL fue de 80%.

7. Callos de Gran Enano pretratados con 0.75M de Sacarosa por 48h y preenfriados con tasa inicial de 0.5°C/min, alcanzan 80% sobrevivencia después de su congelamiento en NL, y son capaces de producir crecimiento cuando son recultivados.

9. Los callos de Musa acuminata ssp. Malaccensis que mostraron crecimiento después del congelamiento en Nitrógeno Líquido fueron los pretratados con 0.5M Sacarosa por 24h; y 0.5M Sacarosa por 24 horas con preenfriamiento hasta -40°C, más NL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estos ensayos con otros agentes crioprotectores, polietilen glicol, sorbitol, glucosa.
2. Probar diferentes mezclas de crioprotectores.
3. Establecer estudios histológicos de los materiales antes y después del congelamiento en Nitrógeno Líquido.
4. Desarrollar un protocolo de regeneración a partir de callos criopreservados.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, I.C.; JARAMILLO, L.A. y MACIAS, D. M. 1982 Cultivo "in vitro" de ápices meristemáticos de plátano. Informe mensual, UPEB 6(53):42-45.
- ANGARITA, A. y CASTRO, D. 1984. Nuevas perspectivas para el control del la Sigatoka Negra Augura (Colombia) 10(2):13-18.
- BAJAJ, Y.P.S. 1979. Freeze preservation of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum*. J. Exptl. Biol. 17:1405-1407.
- BAJAJ, Y.P.S. 1984. The regeneration of plants from frozen pollen embryos and zygotic embryos of wheat and rice. Theoretical and applied genetics. 67:525-528.
- BAJAJ, Y.P.S. 1985. Somoclonal variations and the cryopreservation of germplasm in wheat. American Journal of Botany (Abstract) 72(6) 874.
- BENSON, E. 1990. Free radical damage in stored planta germplas. IBPGR Roma. 128 p.
- BERTRAND DESBRUNAIS, A.; ENGELMAN, F.; DEREUDORE, J.; CHARRIER, A. 1988. Reprise de l'embryogenése adventive a partir d'embryons somatiques de caféier (Coffea arabica L.) après leur congélation dans l'azote liquide. C.R. Acad. Sci. Paris, t. 307 Série III, p. 795-801.
- BERTRAND, A.; FABRE, J.; ENGELMANN, F.; DEREUDORE, J.; CHARRIER, A. 1988. Reprise de l'embryogenése adventive á partir d'embryons somatiques de caféier (Coffea arabica L.) après leur congélation dans l'azote liquide. C.R. Acad. Sci Paris, t, 307, III 795-801.
- BEWLWY, D.J. 1973. The effects of Liquid Nitrogen temperatures on Protein and RNA Synthesis in the moss Tortula ruralis. Plant Science Letters, 1:303-308.
- BLANCO, A. 1985. El problema de Germoplasma en el mundo. In: El cultivo de Tejidos Vegetales en México. M. Roberts y V.M. Loyola. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. pp. 27-34.

- CATIE/GTZ. 1979. Programa de Recursos Genéticos de las plantas cultivadas de América Central. Costa Rica. 30 p.
- CONANAPRAGASAN, S.; VASIL, I.; 1990. Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.) Plant Cell Report 9:419-423.
- CHEN, J.; SUN DE LAN; SUN HUA LANG. 1987. Sugarcane callus Cryopreservation. Plant Cold Hardiness. 323-337.
- CHEN, T.; KARTHA, K.; GUSTA, L. 1985. Cryopreservation of wheat suspension culture and regenerable callus. Plant Cell Tissue Organ Culture. (4) 101-109.
- DE LANGHE, E. 1969. Bananas. In Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Ed. by F.P. Ferwerda y F. Wit. Wageningen, Netherlands. 511p.
- EGELMANN, F.; DUVAL Y. AND DEREUDDRE, J. 1985. Survival and politeration of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos after freezing in liquid nitrogen. C.R. Acad. Sc. Paris (serie III), 301(3):11-116.
- ENGELMANN, F.; OUVAI, Y.; PANNETIER, C.;L 1988. (Cryopreservation of oil palm somatic embryos: Importance of the freezing process.
- ENGELMANN, F.; OUVAI, Y.; PANNETIER, C.;L 1988. Use of cryopreservation for setting up a bank of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. Oléagineux. Vol 431 N°8-9.
- ENGELMANN, F.; OUVAI, Y.; PANNETIER, C.;L 1988. Utilization des techniques de cryoconservation pour la création de banques d'embryons somatiques de palmier 'a nuile (*Elaeis guineensis* Jacq) (1) Oléagineux. 43: (8)(9).
- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from inmature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Reports. 7:665-668.

- FINKLE, J.; ULRICH, J. 1979. Effects of Cryoprotectants in Combination on the Survival of Frozen Sugarcane Cells. *Plant Physiol.* (63) 598-604.
- FINKLE, B.J.; ULRICH, J.M.; RAINS, D.W.; STAVAREK, S.S. 1985. Growth and regeneration of alfalfa callus lines after freezing in liquid nitrogen *Plant Science.* 42(2) 133-140.
- GANESHAN, S. 1985. Cryogenic preservation of grape (Vitis vinifera L.) pollen. *Vitis* 24(3)169-173.
- GROUT, B.; SHELTON, K.; PRITCHARD, W. 1983. Orthodox Behaviour of oil Palm Seed and Cryopreservation of the Excised Embryo for Genetic Conservation.
- HASKINS, R.H.; KARTHA, K.K. 1980. Freeze preservation of leaf meristems: cell survival.
- HENSHAW, G.; STAMPS, J.A. & WESCOTT, R. 1980. Tissue culture and germplasm storage p. 277-282.
- IBPGR. 1990. Partners in conservation. Plant Genetic Resources and the CGIAR SYSTEM. Consultative Group on International Agricultural Research. Editor Ruth D. Raymang. 24 p.
- INIBAP. 1989. Looking ahead a strategy of choice. Montpellier, Francia. 71p.
- INTERNATIONAL BOARD of plant Genetic Resources. 1978. IBPGR working group on the genetic resources of bananas and plantains. Rome. 19 p.
- _____. 1983. IBPGR advisory committee on in vitro storage. First Meeting. Report. Rome 11 p.
- JIAN, L.; SUN, D.; SUN, L.H. 1987. Sugarcane callus cryopreservation. In planta cold hardiness, . 323-337.

- 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 germoplasm using meristem an tissue culture to agriculture and industry. p. 139-161.
- KARTHA, K.K. 1982. Cryopreservation of plant meristems and cells. In plant tissue culture methods. Ed. por Wetter L.R. y Constabel F. National Research Council Canada, Sasktoon, Canada.
- KARTHA, K.K. 1985. Meristem culture and germplasm preservation. In Cryopreservation of plant Cells and Organs. Ed. KK Kartha, CRC Press Inc, Florida. pp 116-134.
- KEITH, C.; MCKENZIE, B.D. 1986. The effect of Abscisic Acid on the Freezing Toleranco of Callus. Cultures of Lotus corniculatus L. Plant Physiol 80, 766-770.
- KURIYAMA. A.; WATANAVE, K.; VENO, S.; MITSUDA, H. 1990. Effect of Post - thaw Treatment on the viability of Cryopreserved Lavandula vera Cells.
- LANGIS, R.; STEPONKUS, P. 1990. Cryopreservation of Rye Protoplants by Vitrification. Plant Physiol. (92):666-671.
- LATTA, R. 1971. Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. Canadian Journal of Botany 49:1253-1254.
- LOVELOCK, J.E.; BISHOP, M.G.W. 1959. Prevetion of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. Nature (London) 183:1394-1395.
- MANZHULIN, A.V.; SHAMAKOVA, L.I.; SKLYAROVA, N. 1984. Production of early high-yielding forms of potato using a pollen cryobank. Sel'skokhozyaistuemaya Biologiya (2)54-56.

- MANZHULIN, A.V.; YASHINA, I.M. 1984. Storage of potato pollen at extremely low temperature. Sel'skokhozyais-tuemaya Biologiya (4)56-59.
- MARIN, L.; MAFLA, G.; ROCA, W.; WITHERS, L. 1990. Cryopreservation of cassava zygotic embryos and whole seeds in liquid nitrogen. Cryo-letters. 11:257-264.
- MATER, A.A. 1987. Production and cryogenic freezing of date palm germplasm and regeneration of plant lets from frozen material. Iraqi Journal of Agricultural Sciences (Supplement) (5) 35-49. Iraq.
- MENENDEZ, T. and SHEPHERD, K. 1975. Breeding new bananas. World Crops. 27(3):104-112.
- McGRAHAN; MERRITT, W. 1961. Studies on the seed of banana. 1. Anatomy of the seed and embryo of Musa balbisiana. American Journal of Botany (EE.UU.) 48:230-237.
- MORA, A. 1990. Estudio del uso de la crioconservación de embriones cigóticos de Musa balbisiana y Musa acuminata. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 109 p.
- MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M.; KARTHA, K.K. 1991. Crioconservación del germoplasma . In cultivo de tejidos en la agricultura: fundamento y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis A. Mroginski. CIAT, Colombia. pp. 715-730.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). Physiol Plant 15:473-497.
- NAG, K.; STREET, H. 1975. Freeze Preservation of Cultured Plant Cells I. The Pretreatment Phase. Physiol. Plant. (34) 254-260.
- _____. Freeze Preservation of Cultured Plant Cells II. The Freezing and Thawing Phases. Physiol. Plant (34) 261-265.
- ORR, W.; SINGH, J.; BROWN, C. 1985. Induction of freezing tolerance in alfalfa cell suspension cultures. Plant cell Reports. 4:15-18.

- PANIS, B.; WITHERS, L.A.; LANGHE, E. 1990. Cryopreservation of Musa Suspension Cultures and Subsequent Regeneration of Plants. *Cryo-Letters*. (11):337-350. ▲
- 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.
- PURSEGLOVE, I. 1981. *Tropical crops: Monocotyledons*. New York, Academic press. 597 p.
- ROWE, P. and RICHARDSON, D.L. 1975. Breeding bananas for disease resistance, fruit quality and yield. *Tech Bull. N02. Trop. Agric. Res. Serv. (SIATSA), La Lima, Honduras, pp. 41.*
- RUBLUD, A. 1985. Estrategias para la Conservación del germoplasma vegetal in vitro. *In: El cultivo de Tejidos vegetales en México. M. Roberts y V.M. Loyola. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. pp' 35-33.*
- SAKAI, A.; SUGAWARA, Y. 1973. Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. *Plant Cell Physiology* 14:1201-1204.
- SALA, F.; CELLA, R. Y ROLLO, F. 1979. Freeze-preservation of rice cells. *Physiol. Plant.* 45:170-176.

- SANDOVAL, MULLER L. 1989. Consideraciones sobre la conservación in vitro de Musáceas; posibilidades y limitaciones. In Revista de la Asociación Bananera Nacional (ASBANA). 13;21-24.
- SCOWCROFT, E.R. 1984. Genetic variability in tissue culture: Impact on germplasm conservation and utilization. A technical report, Rome: IBPGR.
- SEIBERT, M. Y WETHERBEE, P.J. 1977. Increased survival and differentiation of trozen herbaceous plant organ cultured through cold treatment. Plant Physiology. 59:1043-1046.
- SHEPHERD; LAYOLA, D.; ALVES, E. 1986. Mejoramiento genético del banano. Trad. Nitzia Barrantes. In Mejoramiento genético de banano y plátano en Brazil y Honduras. Panamá, UPEP. p. 1-19.
- SIMMONDS, N.W. 1973. Los plátanos. Barcelona. Editorial Blume. 539 p.
- SOTO, B. M. 1990. Bananos: Cultivo y comercialización. 2 ed. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta Lil. 627 p.
- STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. 1987. Bananas. 3a ed. Longman Singapore Publishers. 468 p.
- SUGAWARA, Y.; SAKAI, A. 1974. Survival of Suspension cultures Sycamore Cells Cooled to the temperature of liquid Nitrogen. Plant Phisiol. (54): 722-724.
- SUN, C.N. 1958. The survival of excised pea seedling after drying and freezing in liquid nitrogen. Bot. Gaz. 119:234-236.
- TISSERAT, B.; GABR, M.F.; SABOUR, M.T. 1985. Viability of cryogenically treated date palm pollen. Date Palm Journal 4(1)25-31.
- ULRICH, J.; FINKLE, B.; MACKEY, B.; SCHAEFFER, W.; AND SHARPE, R. 1982 Responses of Six Rice Callus Cultures to Deep-Frozen Temperatures.

- URAGAMI, A.; SAKAI, A.; NAGAI, M.; TAKAHASHI, T. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of Asparagus officinalis cryopreserved by vitrification. *Plant cell reports*. 8:418-421.
- VILLALOBOS, V.; ABDELNOUR, A. 1991. Cryoconservation of *Musa* spp. and its Potential for Long-Term storage of other tropical crops. *In*: DNA Conservation Proceeding. Ed. by Robert P. Adams. pp. 22 (in press).
- WIDHOLM, J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for cultured plant cell. *Stain Technology* 47:189-194.
- WHITERS, L. 1979. Freeze Preservation of Somatic Embryes and clonal Plantlets of carrot (Daucus carota L.) *Plant Physiol.* (63) 460-467.
- WHITERS, L.; KING, P. 1979. Proline: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* (64)675-678.
- WITHERS, L.A. 1983. Germplasm storage in plant technology. *In* *Plant Biotechnology*. Ed. by Mantell and Smith Cambridge. p.1 187-218
- 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. and KING, P.J. 1979. Proline a novel cryoprotectant for the freeze-preservation of Zea mays. *Plant Physiology* 64:675-678.
- WITHERS, L.A. and STREET, H.E.L. 1976. Freeze preservation of plant cell culture. *In* *plant tissue culture an its biotechnological application*. Ed. by W. Barz, E. Reinhar and M.H. Zeenk, Springer, Berlin, pp. 226-244. (Withers, 1987).

YAKUWA, H.; OKA, S. 1988. Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (Morus bombycis Koidz) stored in liquid nitrogen. Annals of Botany. 62(1) 79-82.