



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRISLISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

Tesis presentada en opción al grado académico de MAGISTER SCINTIAE  
en Biotecnología Vegetal

Crioconservación de suspensiones celulares  
embriogénicas del cultivar de plátano CEMSA <sup>3</sup>/<sub>4</sub>.

**AUTOR: Ing. Mayra Jiménez Vázquez**

**TUTOR: MSc. Leyanis García Águila**

*Santa Clara, CUBA*  
2006

## Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Revisión Bibliográfica</b> .....	4
2.1	Origen.....	4
2.2	Taxonomía.....	4
2.3	Importancia.....	5
2.4	Situación en América Latina y el Caribe.....	6
2.5	Características de la Variedad estudiada en esta Tesis.....	6
2.6	Embriogénesis Somática.....	7
2.6.1	Concepto y origen.....	7
2.6.2	características generales de la embriogénesis somática.....	8
2.6.3	factores que influyen en la embriogénesis somática.....	9
2.6.3.1	Genotipo.....	9
2.6.3.2	Explante.....	9
2.6.3.3	reguladores del crecimiento.....	10
2.6.3.4	condiciones de cultivo.....	10
2.6.4	Etapas de la embriogénesis somática.....	11
2.6.4.1	Inducción de la embriogénesis somática.....	11
2.6.4.2	Establecimiento y mantenimiento de células en suspensión.....	11
2.6.4.3	Formación de embriones somáticos.....	12
2.6.4.4	Germinación y conversión de embriones somáticos en plantas...	12
2.7	Embriogénesis somáticas en los plátanos y bananos.....	13
2.8	Conservación <i>in vitro</i> .....	16

2.8.1 Estado del arte de la criopreservación.....	16
2.8.2 Procesos de nucleación y vitrificación.....	17
2.8.3 Factores que influyen en el establecimiento de una metodología de criopreservación para cultivo de callos.....	19
2.8.4 Determinaciones analíticas como indicadores de los daños inducidos por la criopreservación en las membranas celulares.....	25
2.8.5 Importancia de las técnicas analíticas para elucidar las bases biofísicas y bioquímicas de los daños inducidos por la criopreservación...	27
2.8.6 Estabilidad genética del material criopreservado al nivel fenotípico.	28
<b>3 Materiales y métodos.....</b>	<b>31</b>
3.1 Influencia del precultivo con alta concentración de sacarosa en la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas.....	35
3.2 Efecto del precultivo a baja temperatura en la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas.....	36
3.3 Influencia de la concentración de DMSO en la crioprotección de suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas.....	37
3.4 Evaluación de la germinación de los embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas.....	38
3.5 Evaluación de las plantas obtenidas a partir de suspensiones celulares criopreservadas en casa de cultivo.....	38
<b>4 Resultados y discusión.....</b>	<b>40</b>
4.1 Influencia del precultivo con alta concentración de sacarosa en la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas.....	40
4.2 Efecto del precultivo a baja temperatura en la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas.....	42
4.3 Influencia de la concentración de DMSO en la crioprotección de suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas.....	43
4.4 Evaluación de la germinación de los embriones obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas.....	47
4.5 Evaluación de las plantas obtenidas a partir de suspensiones celulares	49

crioconservadas en casa de cultivo.....	
<b>5 Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>6 Recomendaciones.....</b>	<b>53</b>
<b>7 Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>54</b>

## **Resumen**

La conservación *in vitro* de suspensiones celulares embriogénicas del género *Musa* es de gran utilidad para los programas de mejora genética y la propagación masiva de plantas por vía de la embriogénesis somática. La presente investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas con el objetivo de establecer una metodología que permita la crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas obtenidas a partir de callos con estructuras embriogénicas, provenientes de domos meristemáticos de yemas axilares en el cultivar 'CEMSA ¾'; para ello se evaluó la influencia del precultivo con sacarosa y a baja temperatura en el proceso de crioconservación determinado por el porcentaje de vitalidad y el número de embriones somáticos formados a partir de los agregados celulares crioconservados. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el precultivo con sacarosa afecta la vitalidad de las suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas de CEMSA ¾. Se logró la recuperación de las suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas en medio de cultivo de formación de embriones sin diferencias con el control cuando se realizó el precultivo a 4°C. El mayor número de embriones germinados se logró a partir de suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas con 10 % de DMSO. Las plantas obtenidas a partir de las líneas celulares embriogénicas se adaptaron a las condiciones de casa de cultivo con altos porcentajes de supervivencias no se observaron cambios morfológicos en la población estudiada.

## 1. Introducción

En un mundo donde el crecimiento poblacional está superando la producción de alimentos, la agricultura y especialmente la biotecnología vegetal, necesitan ser implementadas rápidamente en diversos aspectos de la vida (Sasson, 2001).

El plátano (*Musa* spp.) está entre los cultivos más importantes en los países del trópico y el subtropical. Junto a los bananos, ocupan el cuarto lugar en importancia a escala mundial después del arroz, el trigo y el maíz. La producción mundial de plátano en el año 2004 fue de 32.7 millones de toneladas y los rendimientos en 63.04 t/ha (FAO, 2004).

La entrada a Cuba del patógeno *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra) en noviembre de 1990, afectó la producción de las empresas dedicadas a este cultivo (Pérez y Orellana, 1994). El principal inconveniente para su mejoramiento genético por métodos tradicionales es el hecho de su esterilidad y poliploidía, lo que implica muchos años de trabajo para crear un nuevo cultivar o diseminar un material genético con interés para la agricultura (Vuylsteke, 2001). Esto crea la necesidad de buscar nuevas alternativas basadas en las técnicas de cultivo de tejidos e ingeniería genética, para complementar programas de mejora genética, así como introducción de nuevos clones.

El cultivar CEMSA 3/4 en la década de los 80 constituía uno de los principales y más generalizados cultivares de plátanos sembrados comercialmente en Cuba. Debido a la susceptibilidad que presenta ante la presencia de la Sigatoka negra las áreas en producción han disminuido notablemente por lo que actualmente se trabaja en su mejoramiento genético en función de inducir resistencia a dicha enfermedad. Es por ello, que se ha implementado el desarrollo de la embriogénesis somática.

En el género *Musa* spp la embriogénesis somática se ha desarrollado con dos propósitos, el mejoramiento genético con la aplicación de técnicas de ingeniería genética y para la propagación masiva de plantas (Grapin *et al.*, 1998).

Las suspensiones celulares embriogénicas de plátanos y bananos, constituyen el material vegetal de elección para los trabajos de transformación genética y propagación masiva. Las mismas pueden ser exitosamente transformadas mediante bombardeos de partículas (Sagi *et al.*, 1998) y *Agrobacterium* (Chong *et al.*, 2002). La iniciación de una suspensión celular embriogénica es un procedimiento lento y difícil. Una vez establecida está sujeta a variación somaclonal y contaminación microbiana. Además, un prolongado período de cultivo puede dar como resultado una disminución o pérdida total de la capacidad morfogénica.

Para asegurar la disponibilidad de estos materiales vegetales importantes para el mejoramiento y las producciones futuras, es esencial conservar el germoplasma de *Musa* de manera segura.

La opción más efectiva para resolver este problema es la criopreservación. Esta se considera una técnica de conservación *in vitro* a largo plazo, ya que permite el almacenamiento a temperaturas ultra-bajas, preferiblemente la del nitrógeno líquido (-196°C), a estas temperatura la velocidad de las reacciones químicas y biofísicas es tan lenta que no causan deterioros biológicos (Withery Engelmann, 1997).

Las técnicas de criopreservación en principio son aplicables a cualquier tipo de tejido vegetal con potencial de regeneración. Las mismas han sido desarrolladas para más de 112 especies de plantas diferentes, cultivadas de manera diversas, incluyendo suspensiones celulares, callos, ápices, embriones somáticos y cigóticos (Engelmann, 1997).

Con el empleo de estas técnicas, los materiales vegetales se preservan en espacios reducidos, protegidos de la contaminación y no se necesitan muchas labores de mantenimiento más que la de controlar el nivel de nitrógeno líquido en los termos de almacenamiento (Sakai, 2000). Sin embargo el material vegetal para ser criopreservado debe superar diferentes momentos estresantes ocasionados a las células; por ejemplo, la exposición a las bajas temperaturas, formación de cristales de hielo y la deshidratación severa (Reinhoud *et al.*, 2000).

Panis y Thinh, (2001) describen un protocolo para la crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas de bananos. Sin embargo, el mismo requiere modificaciones que dependen del material de origen de la suspensión celular, así como del genotipo.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, nuestro trabajo estuvo encaminado a la comprobación de la hipótesis siguiente: **Es posible la crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar de plátano ‘CEMSA 3/4’.**

Para dar cumplimiento a esta hipótesis, en el presente trabajo se establecieron los siguientes objetivos:

- ✍ Evaluar la influencia del precultivo con sacarosa y a baja temperatura en la crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas.
- ✍ Determinar la concentración de dimetilsulfóxido en la crioprotección de suspensiones celulares embriogénicas.
- ✍ Evaluar la germinación de los embriones somáticos obtenidos a partir de suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas.

## **2. Revisión bibliográfica**

### **2.1 Origen**

El centro de origen del género *Musa* es el sureste de Asia, extendiéndose desde La India hasta Papua, Nueva Guinea e incluyendo a Malasia e Indonesia. En esta región todavía existe hoy en día un gran número de variedades silvestres con semillas. Se piensa que la domesticación surgió en esta región como resultado de mutaciones en las especies silvestres, obteniéndose una producción de plantas con frutos comestibles y sin semillas. Los diploides (AA) y triploides (AAA) de *Musa Acuminata* fueron llevados por el hombre a áreas donde *Musa balbisiana* es nativo y la hibridaciones naturales resultaron en la formación de progenies con los genomas AB, AAB y ABB (Simmonds, 1962). La historia de las variedades de plátanos y bananos está vinculada al movimiento temprano de la población humana.

Aunque se señala que los portugueses fueron los primeros en introducir los plátanos y bananos en América, el origen que los portugueses fueron los primeros en introducir los plátanos y bananos en América, el origen de estos cultivos en el nuevo mundo aún queda como tema de discusión. Se piensa que los plátanos y bananos fueron llevados desde África hasta Las Islas Canarias temprano en 1400 y de allí Friar Tomas Berlanga introdujo un clon no identificado en Santo Domingo, Republicana Dominicana, en 1516 (Simmonds, 1966). Esta es considerada la primera de muchas más introducciones durante años.

### **2.2 Taxonomía**

Los plátanos son plantas herbáceas, con un falso tallo de forma cilíndrica, formado por las vainas de las hojas superpuestas, un cormo y un sistema radical fibroso (López, 1989). Pertenecen al género *Musa*, el cual es parte de la familia *Musaceae*. La familia *Musaceae* contiene dos género, *Musa* y *Ensete*.

El género *Ensete* probablemente se originó en Asia y se disperso rápidamente a África. Las especies más importantes es *E. ventricosum* (Welw) Cheesm. Esta especie es un cultivo básico alimentario en parte del sur de Etiopía.

El género *Musa* está dividido en cuatro secciones: *Callimusa*, *Australimusa*, *Eumusa* y *Rhodochlamys*. Las especies en las secciones *Callimusa* y *Rhodochlamys* son de interés ornamental ya que no producen fruto comestible.

La sección *Australimusa* contiene *Musa* textiles (Abaca), cultivado particularmente en Filipinas para la producción de “Manila hemo”, Esta especie rinde una fibra fuerte, la cual es usada en la manufactura de sogas marinas y en la industria pesquera pues la misma es resistente a la humedad y al agua salada.

Virtualmente todas las variedades cultivadas de plátanos y bananos han surgido de *Eumusa*. Esta sección es la más grande del género y la más dispersa geográficamente. La misma contiene alrededor de 11 especies, pero la mayoría de los cultivares son derivados de solo dos, *Musa Acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B).

### **2.3 Importancia**

Como alimento para los humanos, los plátanos pueden ser consumidos hervidos, fritos o tostados (INIBAP, 1998). El fruto del plátano es altamente energético y sus carbohidratos son fácilmente asimilables. Es rico en vitaminas A, B, C, E y en minerales. Por el contenido de vitamina A, los plátanos pueden ayudar a la digestión. El jugo de las flores masculinas suministra un remedio para problemas estomacales en personas de todas las edades. En tanto hay reportes que el fruto maduro se usa en tratamientos de asma y bronquitis. Su importancia medicinal hace que sirva para muchas otras cosas (Tompson, 1995).

El uso del plátano para preparar bebidas alcohólicas está muy generalizado en los países tropicales. En el centro y este de África, el jugo del fruto maduro de variedades conocidas como beer banana, se puede tomar fresco o fermentado para hacer una cerveza con bajo contenido de alcohol. La cerveza es importante desde el punto de vista nutricional porque es rica en vitamina B debido al contenido de levadura. En Uganda y Sudan, los bananos de estas variedades son destilados para producir alcohol de banano o waragi (INIBAP, 1998). Thompson (1985) señaló que las hojas de plátano tienen diversos usos.

## **2.4 Situación en América Latina y el Caribe**

Alrededor del 70% de los plátanos y bananos en América Latina y el Caribe son consumidos localmente, y los plátanos en particular (*Musa* spp. AAB) juegan un papel muy importante en la seguridad de la alimentación en la región. Según la Corporación Colombia Internacional el consumo fresco para el año 1999 se estimó en 62 kg/persona/año, uno de los más altos del mundo. Por esta región, los pequeños negocios producen un amplio rango de productos procesados de plátanos, los cuales suministran una fuente adicional de empleo e ingresos muy importantes.

En Cuba, una nueva fase de desarrollo del cultivo se inicia con el empleo de las plantaciones de material propagado *in vitro* y el uso del riego localizado, reemplazando algunos clones establecidos por otros resistentes a enfermedades como el Burro CEMSA (ABB), Pelipita (ABB). En la última década Cuba ha introducido algunos cultivares híbridos de plátanos procedentes de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) dentro de los cuales se encuentran los FHIA-20 y FHIA-22 (Bermúdez , 2000).

## **2.5 Características de la variedad estudiada en esta tesis. González L. 2005**

- Nombre de la variedad: CEMSA ¾
- Origen: Cuba
- Tipo de plátano: Vianda
- Genoma/Ploidía: AAB
- Subgrupo: Plantain (Pseudohom)
- Uso: Consumo procesado (hervido o frito, verde o maduro)

### **Características de la planta**

#### ***Morfológicas***

- Hábito foliar: Normal
- Altura del pseudotallo: 2.1-2.9m
- Aspecto del pseudotallo: Normal
- Color de pseudotallo: Verde Rojizo
- Pigmentación vaina internas: Rosado Malva
- Número hijos: 2

- Desarrollo de hijos: Entre 1/4 y 3/4 del tamaño planta madre
- Posición racimo: Pendura verticalmente
- Frutos: Uniseriados
- Forma frutos: Curva poco marcada
- Longitud frutos: 21-25 cm.
- Sección transversal fruto: débilmente pronunciado
- Forma del ápice fruto: Puntigudo
- Color cáscara madura: Amarilla
- Color pulpa madurez: Amarillo
- Sabor predominante: Astringente

### ***Producción***

- Diámetro de los dedos: 50mm
- Peso neto (sin caquis) del racimo: 8.4kg
- Numero de manos por racimo: 7
- Número de dedos por racimo: 39

### ***Reacción a enfermedades***

- Sigatoka negra: Susceptible
- Mal de Panamá: Resistente
- Nemátodos: Susceptible
- Pudrición de corona: Medianamente resistente

## **2.6. Embriogénesis Somática.**

### **2.6.1 Concepto y origen.**

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Merkle *et al.*, 1995). Normalmente, los tejidos inoculados *in vitro* tienen que ser expuestos a reguladores de crecimiento y otros factores de estrés para la inducción de la embriogénesis somática.

Pioneros de la embriogénesis somática *in vitro* fueron Levine (1950), Wiggans (1954) y Steward *et al.* (1958), los cuales descubrieron la formación de yemas y estructuras pro embriogénicas en *Daucus* después de disminuir las concentraciones de auxinas iniciales

en el medio de cultivo. Estos autores fueron los primeros en demostrar la totipotencia en células somáticas de plantas.

La embriogénesis somática ha sido descrita para un amplio rango de plantas (Tisserat *et al.*, 1979). Sin embargo, la inducción de embriones somáticos y la regeneración de plantas aun no es rutina ni eficiente para la mayoría de las especies. Merkle *et al.* (1995) plantearon que mientras más cerca llega el patrón de la expresión génica del embrión somático al del embrión cigótico, más alta será la posibilidad de obtener un sistema de regeneración altamente eficiente.

### **2.6.2. Características generales de la embriogénesis somática.**

La embriogénesis puede ser considerada como un caso extremo de plasticidad fenotípica, donde varios estados de desarrollo pueden ser alterados en las condiciones apropiadas (Dudits *et al.*, 1995). Schoofs (1997) planteó que al alterar las condiciones de crecimiento y someter los tejidos u órganos inoculados a condiciones no usuales, puede ocurrir que la planta anule o altere la expresión del gen relacionado a una función específica que tenía en la planta y que sea competente a las señales inductivas para la embriogénesis somática. Todas las células somáticas dentro de una planta contienen el conjunto completo de información genética para regenerar una planta completa y funcional (Merkle *et al.*, 1995).

Al contrario a la embriogénesis directa de células somáticas determinadas preembriogénicamente, las células vegetales altamente diferenciadas requieren mayores estímulos para inducir el estado embriogénico. Reguladores del crecimiento y/u otros factores de estrés para inducir la dediferenciación y la división celular. Estas células son denominadas células somáticas no embriogénicas. La inducción de la embriogénesis somática de estas células es indirecta porque una fase intermedia de callo está involucrada. El éxito de la embriogénesis entonces depende de la "distancia" epigenética que tienen las células en el explante, del estado embriogénico (Merkle *et al.*, 1995). El origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos está relacionado con la madurez de la célula o la distancia epigenética del estado embriogénico en explantes multicelulares (Williams y Maheswaran, 1986).

### **2.6.3. Factores que influyen en la embriogénesis somática.**

#### **2.6.3.1. Genotipo.**

Asumiendo que la inducción de la embriogénesis somática posiblemente involucra la activación de la misma ruta genética como la embriogénesis cigótica, la embriogénesis somática debe ser un fenómeno universal para todas las plantas que producen semillas. No obstante, genotipos individuales dentro de una especie pueden variar grandemente en su capacidad embriogénica. Tales diferencias de genotipo pueden deberse a diferencias en la habilidad para activar elementos fundamentales en la ruta embriogénica (Merkle *et al.*, 1995).

Muchos autores han reportado sobre la dependencia del genotipo (Ivanova *et al.*, 1994; Jeannin *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1995). Las respuestas embriogénicas también pueden variar entre cultivares o entre individuos de un cultivar dado (Feirer y Simon. 1991).

Schoofs (1997) planteó que la facilidad con que se puede romper la dominancia apical de proliferaciones *in vitro* de que cultivo estaba correlacionada al porcentaje del cromosoma B en el genoma del cultivar. Dhed'a (1992) logro establecer suspensiones celulares de cinco cultivares, todos los cuales contienen por lo menos un conjunto de cromosomas B en su genoma. Como tal, puede concluirse que la inducción exitosa de la embriogénesis somática en el genero Musa parece estar muy relacionada a la composición del genoma.

#### **2.6.3.2. Explante.**

La selección del explante puede ser un factor fundamental que determina el fracaso o el éxito de un protocolo embriogénico (Brown *et al.*, 1995; Krishnaraj y Vasil, 1995). El explante más común para monocotiledóneas y dicotiledóneas es el embrión cigótico inmaduro. Sin embargo, en monocotiledóneas las células se diferencian rápidamente y pierden su totipotencia. La presencia de tejidos maduros y más diferenciados inhibe la expresión de la competencia embriogénica en las células (Vasil, 1987).

Para células y tejidos determinados preembriogénicamente, el uso solo de citoquinina puede ser suficiente para inducir la embriogénesis somática, mientras que para células no embriogénicas o más diferenciadas, es necesaria una auxina o una auxina en combinación con una citoquinina (Schoofs, 1997). La selección del mejor explante

puede variar de especie a especie. No solo el tipo de explante, también la edad, estado de desarrollo y nivel de diferenciación, parecen influenciar en la respuesta embriogénica.

Ivanova *et al.* (1994) encontraron que los explantes de hojas en *Medicago falcata* son mejores cuando se toman de plantas con 30 días de edad, ya que en etapas más tardías los niveles de ácido indolacético (AIA) endógenos disminuyen significativamente. Altos niveles de AIA endógenos están correlacionados con una respuesta embriogénica rápida.

### **2.6.3.3. Reguladores del crecimiento.**

Las auxinas y especialmente la auxina sintética ácido (2,4-D), son los inductores más eficientes del potencial embriogénico (Ammirato, 1983). El éxito de las auxinas sintéticas, como el 2,4-D en la inducción de la embriogénesis somática, ha sido atribuido a la potencia de estas auxinas (Schoofs, 1997).

La concentración de auxina y el tipo necesario para inducir la embriogénesis somática depende altamente de la especie y el tipo de explante. En general, las monocotiledoneas y especialmente las Poaceae, necesitan auxinas fuertes a altas concentraciones a diferencia de especies dicotiledóneas (Vasil, 1985). La inducción de la embriogénesis somática por las auxinas es un proceso dependiente de la concentración (Schoofs, 1997), sin embargo, De Vries *et al.* (1988) encontraron que por encima de una concentración umbral, el desarrollo del potencial embriogénico fue independiente de la concentración del 2,4-D.

El nivel de auxinas necesario para mantener la embriogénesis repetitiva o secundaria, varía entre especies. En zanahoria (*Daucus carota* L.), mijo (*Panicum miliaceum*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), las suspensiones celulares embriogénicas son mantenidas a concentraciones relativamente altas de auxina (Satoh *et al.*, 1986; Kiyosue *et al.*, Dhed' a *et al.*, 1991).

### **2.6.3.4 Condiciones de cultivo.**

Las condiciones de temperatura e intensidad luminosa óptima, ciertamente varían de especie a especie. McCain *et al.* (1988) indujeron callos embriogénicos friables de

embriones inmaduros de maíz (*Zea mays*) en la oscuridad. Inflorescencias inmaduras fueron cultivadas en la oscuridad o a bajas intensidades luminosas en Phoenix dactylifera (Bhaskaran y Smith, 1992). Lazzerri *et al.* (1987) plantearon que los tubos fluorescente GroLux, que suministran más luz en el espectro rojo, pueden promover la formación de callos embriogénicos en soja (*Glicine max*).

#### **2.6.4. Etapas de la embriogénesis somática.**

##### **2.6.4.1. Inducción de la embriogénesis somática.**

La inducción de la embriogénesis somática no siempre está segura, aún con explantes idóneos, extirpados de plantas creciendo bajo condiciones óptimas, colocados en medio de inducción adecuado, con las concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento correctas (Schoofs, 1997). Mientras que las auxinas pueden inducir respuestas embriogénicas en tejidos maduros de plantas dicotiledóneas, la embriogénesis somática en plantas monocotiledóneas solo puede ser inducida desde células meristemáticas y células diferenciadas parcialmente (Krishnaraj y Vasil, 1995).

##### **2.6.4.2. Establecimiento y mantenimiento de células en suspensión.**

Como material de partida para el establecimiento de suspensiones celulares en la mayoría de los cultivos se emplean callos con embriogénesis somática de alta frecuencia y/o embriones somáticos obtenidos, pero en estados iniciales de desarrollo (Gómez, 1998). También puede lograrse a partir de: tallos, hojas, secciones de hipocotilos, pétalos, meristemas apicales, ovarios, embriones cigóticos, tubérculos, filamentos de antenas y fragmentos de cotiledones (Dennis *et al.*, 1993).

Además de las células embriogénicas, muy frecuentemente se encuentran células no embriogénicas en las suspensiones celulares (Dhedá *et al.*, 1991). Nayak y Sen (1989) denominaron las células ricas en almidón, en los cultivos de suspensiones de mijo, parcialmente embriogénicas. Ellas aun pueden ser transformadas en células embriogénicas bajo condiciones adecuadas.

Nayak y Sen (1989) encontraron que tanto el intervalo de subcultivo como la temperatura de incubación, influyen en la frecuencia relativa de las células embriogénicas. Cuando las suspensiones celulares no son subcultivadas frecuentemente,

la suspensión se torna mucilaginosa (Vasil y Vasil, 1982). Estas mismas observaciones fueron hechas en suspensiones celulares de Musa (Panis, 1995). Al llegar al tiempo de cultivo, estas pierden sus características embriogénicas, el color de la suspensión cambia, y las células son menos densas. Estudios histológicos revelaron la acumulación de almidón y vacuolación en células más viejas. Para evitar esto, el medio debe ser cambiado antes de llegar al fin de la fase exponencial de la curva de crecimiento (Schoofs, 1997).

También la densidad celular tiene un impacto sobre la proliferación celular y mantenimiento de las características embriogénicas. Mejores resultados fueron obtenidos al diluir la suspensión a 1/3 (Schoofs, 1997). Toonen *et al.* (1994) señalan que densidades celulares hasta 10 000 células. mL<sup>-1</sup>, son necesarias para inducir las divisiones celulares. Ho y Vasil (1983) hacen referencia a métodos de subcultivo que afectan la tasa de crecimiento de las células y la densidad de grupos de estas en cultivos de la caña de azúcar.

#### **2.6.4.3. Formación de embriones somáticos.**

Para inducir la formación de embriones a partir de masas proembriogénicas, las células embriogénicas pueden ser transferidas a un medio de cultivo con concentración de auxina más baja (Ho y Vasil, 1983), con menos auxinas activas (Hepher *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1993) o desprovisto de auxinas (Choudhary y Chin, 1995; Amarasinghe *et al.*, 1996).

Muy frecuentemente, los cultivos de células también son diluidos al ser transferidos a medios de cultivo para la inducción de embriones (Jansen *et al.*, 1990; Sterk *et al.*, 1991). Sung y Okimoto (1981) encontraron que la dilución y la eliminación de auxina son necesarias para el desarrollo normal del embrión.

#### **2.6.4.4. Germinación y conversión de los embriones somáticos en plantas.**

La germinación es muy importante en el proceso de la embriogénesis somática y es diferente de la conversión. La germinación se refiere al desarrollo de la raíz y/o brote, mientras que la conversión se define por Stuart y Strickland (1984) como la supervivencia y desarrollo en fase del propágulo en condiciones ambientales *ex vitro*, o

sea, en el suelo. La habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Fuji *et al.*, 1990).

### **2.7 Embriogénesis somática en los plátanos y bananos.**

El explante inicial más usados para la embriogénesis somática en *Musa* spp. ha sido la flor masculina inmadura (Ma, 1991; Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 1996a). Marroquín *et al.* (1993) lograron la regeneración de suspensiones embriogénicas usando embriones cigóticos jóvenes, pero este procedimiento está limitado a las especies seminíferas. Dhed'a (1992) Schoofs (1997) lograron establecer suspensiones celulares de scalp, definido como la parte meristemática entre 4-6mm de pequeños meristemas blancos; estos también se denominan multiyemas, Grapin *et al.* (1998) señalan sobre el uso de las flores femeninas. Este método, sin embargo resulta en la pérdida del racimo y la planta, por lo tanto, es difícil su aplicación en gran escala.

Todos los explantes somáticos empiezan por producir glóbulos meristemáticos, también denominados callos nodulares. Estos glóbulos meristemáticos no son embriogénicos, sin embargo, pueden desarrollar estructuras embriogénicas (Dhed'a *et al.*, 1992) o formar un callo blanco traslúcido, del cual se desarrollan los embriones somáticos (Escalant *et al.*, 1994).

Côte *et al.* (1996) plantearon que después de cultivar flores masculinas de Gran Enano (AAA) durante 5-6 meses, se obtuvo callos amarillos y tejidos embriogénicos friables con numerosos embriones. Para este mismo cultivar, Escalant *et al.* (1994) plantearon que la respuesta embriogénica de las flores masculinas nunca excedió el 5%. Navarro *et al.* (1997) lograron la formación de callos amarillos compactos del 50% de los explantes establecidos, sin embargo, solo del 2 al 6% del número inicial de explantes dio origen al callo blanco embriogénico. La respuesta de los tipos Cavendish es altamente variable y usualmente menor de 1% cuando se usa scalp como explante (Schoofs *et al.*, 1999). Grapin *et al.* (1998) reportaron valores de 1.9% y 2.9% en Curaré Enano (AAB) y Curaré (AAB) respectivamente usando flores femeninas como explantes.

Hay numerosos reportes sobre la suspensión celular embriogénica y la subsiguiente regeneración de plantas, pero solo en pocas especies se han realizado estudios

histológicos sobre células embriogénicas (Dhed'a *et al.*, 1991; Panis, 1995; Côte *et al.*, 1996; Grapin *et al.*, 1996a).

Algunas células periféricas en agregados embriogénicos de Musa, pueden ser ricas en almidón. Sin embargo, la acumulación de almidón en estas células puede estar vinculada a la diferenciación celular y la pérdida de la potencia embriogénica, como tal las células que aumentan el contenido de la vacuola, adquieren una forma esférica y tienden a ser aisladas (Panis, 1995; Côte *et al.*, 1996). Panis (1995) encontró que la acumulación de almidón y el contenido de la vacuola aumentan en la mayoría de las células embriogénicas en la fase post-exponencial de las suspensiones celulares embriogénicas de Musa.

Marroquin *et al.* (1993) plantearon que numerosas células se liberaron en el medio líquido para formar una suspensión en Musa acuminata. La observación microscópica mostró muchas células aisladas con características embriogénicas: citoplasma denso, gran núcleo central con grandes nucleolos, grandes cantidades de proteínas de reserva y algunos granos de almidón (Willians y Maheswaran, 1986). Estas suspensiones también contenían muchos agregados pequeños de células embriogénicas (2 a 5 células) y pocas células elongadas.

Côte *et al.* (1996) plantearon que los primeros embriones fueron discernibles 20 a 30 días después que la suspensión fue plaqueada sobre el medio de cultivo. Después de 80 días, el número promedio de embriones formados por mililitro fue  $30 \times 10^3 \pm 65 \times 10^3$ . Novak *et al.* (1989) reportaron números de  $20-30 \times 10^3$  en suspensiones de cultivares de bananos diploides y triploides, obtenidos de cultivo de rizomas. Grapin *et al.* (1996a) demostraron que fue posible obtener 300 embriones de un agregado de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Bieberach (1995) observó la formación de embriones somáticos cuatro meses después del cultivo de Gran Enano y seis meses después del cultivo de Dominico (AAB). El promedio de embriones somáticos diferenciados de 1.0 mL de suspensión celular, fue de 439 en medio líquido y de 197 en el medio semisólido. Mientras Barranco (2000) obtuvo en el cultivar Gran Enano los mejores resultados al 15% de densidad celular, formando así  $2561.5 \pm 95.3$  embriones somáticos en medio líquido y  $219.5 \pm 9.0$  en

medio semisólido a partir de 1.0 mL de células. Gómez *et al.* (2002), a partir de la misma cantidad de suspensión celular obtuvieron 1883 embriones somáticos en etapa globular después de 30 días de cultivo. Estos estudios se realizaron en medio de cultivo líquido en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB).

El porcentaje de germinación en el cultivar Gran Enano depende del tamaño de los embriones somáticos. Los que miden de 100 a 250  $\mu\text{m}$  de longitud, lograron un porcentaje promedio de 3% y los que miden de 800 a 1000  $\mu\text{m}$ , un 20% (Côte *et al.*, 1996). Dhed'a *et al.* (1991) señalaron porcentajes de germinación de 10 a 23% en el cultivar Bluggoe (ABB) cultivado de meristemo, mientras que Novak *et al.* (1989) mencionaron de 1.5 a 12% en bananos y banano de cocción cultivados por rizomas. Marroquín *et al.* (1993) lograron porcentajes de germinación de 20 a 36% en *Musa acuminata*, mientras que Grapin *et al.* (1996a) obtuvieron en el plátano French Sombre (AAB) porcentajes de germinación de 10 a 40%. Estos resultados son bajos en comparación con los que han logrado autores como Escalant *et al.* (1994) en diferentes cultivares y Navarro *et al.* (1997) en *Musa acuminata*, quienes obtuvieron entre 60 y 70% de germinación. Todos estos resultados indican que el genotipo influye en el proceso de la germinación.

Barranco (2001) propuso una metodología para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en el cultivar híbrido FHIA-18 (*Musa sp.* AAAB). Este autor que multiplica la suspensión celular con 3% de densidad celular y con 100 mg de masa fresca (mgMF) logró la formación de  $1871 \pm 9.32$  embriones somáticos. Utilizando medio de cultivo semisólido, obtuvo 40.6% de germinación, mientras que Cabrera (2001) en el cultivar Navolean. *Musa sp.* (AAB), logró 49.33%. Ambos autores lograron porcentajes mayores del 70% al usar medio de cultivo líquido.

Barranco (2001) logró 98.5% de conversión en plantas procedentes de la organogénesis así como la embriogénesis somática en el cultivar híbrido FHIA-18. Mientras que Cabrera (2001), en un estudio similar en el cultivar Navolean, obtuvo 95% de conversión

## **2.8. Conservación *in vitro*.**

En general, los métodos de conservación *in vitro* varían en dependencia de la duración del almacenamiento que se requiera; para corto - mediano plazo el objetivo es reducir la velocidad de crecimiento del material vegetal, usualmente, mediante la disminución de la temperatura del cultivo o reguladores del crecimiento (Engelmann, 1997).

Para largo plazo se prefiere la crioconservación (almacenamiento en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ ), ya que se detienen todos los procesos metabólicos y la división celular. El material crioconservado se preserva por largos períodos de tiempo en espacios reducidos, condiciones seguras, sin grandes costos de mantenimiento y se reducen las causas de variabilidad genética (Ashmore, 1997).

Según Engelmann y Takagi (2000), se reconocen dos grupos de técnicas en la crioconservación: (1) las técnicas clásicas basadas en la deshidratación química parcial con osmoprotectantes y el congelamiento programado y (2) las técnicas nuevas basadas en la vitrificación, entendida como el cambio del estado líquido a un estado intermedio "glass" evitando la formación de cristales de hielo, potencial causa de daño mecánico a las membranas durante la congelación (Towill 1996).

Dentro de las técnicas nuevas se reconocen siete procedimientos que incluyen: Encapsulación-deshidratación, Vitrificación *per se*, Encapsulación-vitrificación, Deseccación, Pre-crecimiento, Pre-crecimiento-deseccación y la Técnica de la microgota (Engelmann 2000).

### **2.8.1 Crioconservación de especies vegetales.**

El primer informe sobre la crioconservación de células vegetales lo constituyen los trabajos del japonés Akira Sakai. El observó que tejidos endurecidos durante el invierno se mantenían vivos después de someterse a ultra bajas temperaturas y demostró que pequeñas ramas de mora altamente endurecidas y deshidratadas por congelación resistían la inmersión en nitrógeno líquido (Sakai, 1960).

Hasta la fecha, la crioconservación de los callos se ha desarrollado con éxito para más de 20 especies de plantas (Reinhold *et al.*, 2000) no sin presentar innumerables

problemas durante su aplicación. Esto se debe a que los callos, como los demás sistemas experimentales empleados (suspensiones celulares, ápices, embriones, etc), contienen gran cantidad de agua en sus células y son extremadamente sensibles a la congelación-descongelación (Sakai,, 2000).

### **2.8.2 Procesos de nucleación y vitrificación.**

Existen mecanismos fundamentales que determinan cómo todos los sistemas biológicos responden ante la disminución de las temperaturas y la solidificación del agua líquida. De esta forma, primero es necesario conocer los aspectos básicos que tienen lugar durante la congelación del agua como eventos decisivos para desarrollar una metodología de crioconservación. En este sentido, se destacan los procesos de nucleación y vitrificación.

#### **➤ Nucleación.**

Recientemente, diferentes autores han realizado definiciones aclaratorias sobre los fenómenos que ocurren durante la formación de los cristales de hielo a las bajas temperaturas. Por ejemplo, Zachariassen y Kristiansen (2000) informaron que la definición actualizada de punto de congelación de una solución es la temperatura donde el último y más pequeño cristal de hielo se derrite cuando una solución congelada se calienta lentamente, y se le denomina temperatura de congelación en equilibrio o punto de fusión.

Zachariassen y Kristiansen (2000) plantearon también que el fenómeno por el cual las soluciones se encuentran aún en estado líquido a la temperatura de congelación en equilibrio se conoce como sub-enfriamiento, encontrándose varios grados de temperatura inferiores hasta congelarse espontáneamente, y esta temperatura se denomina punto de sub-enfriamiento de la solución. Además, diferencian que de manera no-coligativa pueden aparecer cristales de hielo a determinada temperatura sin afectar el punto de fusión de la solución y les denomina al fenómeno histéresis térmica y la temperatura a la que ocurre punto de congelación de histéresis.

Por otra parte, en la actualidad existen discrepancias entre los investigadores porque hasta hace poco se diferenciaba que para cualquier solución el fenómeno de sub-

enfriamiento se interrumpía cuando ocurría la formación espontánea de núcleos de cristales de hielo (nucleación homogénea) o mediante la adición de algún catalizador para inducirlos (nucleación heterogénea) (Belous *et al.*, 1987). Incluso los autores Zachariassen y Kristiansen (2000) apoyan estas diferencias; y definen como nucleación homogénea la causada por las propiedades de atracción electrostática entre las partes polares de las moléculas de agua para formar agregados en forma de cristales de hielo a medida que disminuye la temperatura; y definen la nucleación heterogénea si la agregación de las moléculas de agua se catalizan por sustancias diferentes a estas moléculas.

Sin embargo, Wilson *et al.* (2003) se oponen a esta diferenciación y demostraron que la nucleación en las soluciones biológicas son todas heterogéneas y el término de nucleación homogénea debe ser evitado. Estos autores plantean que en la práctica la nucleación homogénea es poco probable de lograrla en condiciones de laboratorio, y solamente el término debe utilizarse en situaciones muy precisas como en el caso de pequeñas muestras de agua ultra-pura emulsionadas en aceite que tiene una temperatura alrededor de los  $-40^{\circ}\text{C}$  (Broto y Clause, 1976).

➤ **Vitrificación.**

Cuando una solución está altamente concentrada y por ende viscosa, ésta no permitirá la iniciación de cristales de hielo ni su crecimiento. Si se disminuye rápidamente la temperatura a valores muy bajos, la solución puede llegar a convertirse en sólido amorfo (vítreo) sin la formación de cristales de hielo (Franks, 2003). Este proceso se denomina vitrificación y tiene lugar a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).

Para realizar la crioconservación mediante la vitrificación, Fahy *et al.* (1984) propusieron que se requiere de una congelación por debajo de la temperatura de transición vítrea de la mezcla crioprotectora y un re-calentamiento sin la formación de hielo. El problema de la toxicidad del crioprotector se minimiza utilizando la menor concentración de la mezcla crioprotectora para lograr ese objetivo. Aún en la actualidad se reconoce que teóricamente, la concentración mínima se determina por la concentración donde la temperatura de nucleación homogénea ( $T_h$ ) se intercepta con la temperatura de transición vítrea (Wowk *et al.*, 2000).

A concentraciones más bajas, la muestra debe atravesar la zona entre  $T_h$  y  $T_g$  donde la nucleación homogénea del hielo es inevitable. A concentraciones altas, la vitrificación es teóricamente posible a cualquier velocidad de congelación o re-calentamiento si la nucleación heterogénea no está presente.

En la práctica la nucleación heterogénea siempre está presente como obstáculo a la vitrificación, aún cuando la nucleación homogénea se minimiza o evita, y de esta depende la concentración mínima para la vitrificación en condiciones reales. Después de la vitrificación se necesita una velocidad de calentamiento rápida para evitar el crecimiento de los cristales de hielo (desvitrificación) que comienza a temperaturas cercanas a la terminación de la congelación y comienzo del recalentamiento) (Franks, 2003).

El proceso de vitrificación es de gran importancia para la supervivencia de las células vegetales congeladas hasta  $-196^\circ\text{C}$ , ya que previene la formación intracelular de cristales de hielo. El sólido amorfo (vítreo) presenta una menor presión de vapor de agua que el correspondiente sólido cristalino, y de esta manera previene la sobre-deshidratación causada por la congelación extracelular. Como consecuencia, el sólido amorfo evita la excesiva contracción celular, el aumento de la concentración de solutos internos y las alteraciones en el pH de la célula. Además, como la formación vítrea es muy viscosa, ésta puede detener todas las reacciones químicas que requieren una difusión molecular. De esta forma, la vitrificación de las células vegetales garantiza la dormancia y estabilidad durante el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido (Crowe *et al.*, 1998, Franks, 2003).

### **2.8.3 Factores que influyen en el establecimiento de una metodología de crioconservación para cultivo de callos.**

#### **➤ Características fisiológicas.**

Para establecer cualquier estrategia de conservación *in vitro*, se hace indispensable el dominio de una metodología de propagación, que garantice altos niveles de supervivencia.

El origen del material vegetal a conservar puede ser *in vivo* o *in vitro*, especialmente este último ofrece la ventaja de estar en condiciones asépticas, libres de microorganismos patógenos y contaminación superficial (Dereuddre y Engelmann, 1987).

Como regla general debe ser escogido en estado juvenil (Engelmann, 1991). Las células de este tipo son más resistentes a las bajas temperaturas por tener un tamaño pequeño, el citoplasma denso y pocas vacuolas, lo que implica que el contenido de agua intracelular sea bajo, aspecto importante a tener en cuenta para evitar daños por el frío (Kärtha, 1985).

El uso de plantas *in vitro* facilita el manejo del estado fisiológico, garantiza una edad homogénea y permite disponer de material abundante en períodos de tiempo relativamente cortos. Estas plantas deben haber sido objeto de un subcultivo reciente a medio de cultivo fresco (González, 1996).

Harding *et al.* (1991) indicaron como aumentaba la susceptibilidad de los ápices de papa a la congelación, cuando se realizaba el cultivo de tejidos prolongado.

En otros casos se hace necesario desarrollar, una composición de medio de nutrientes que favorezca la aparición de estructuras con características especiales. En la palma de aceite se logró un tipo de embrión de color blanco brillante y generalmente ubicados en grupos, los cuales fueron capaces de soportar las bajas temperaturas y regenerar posteriormente plantas (Engelmann, 1986).

En plátano, se indujo la formación de brotes meristemáticos debido al precultivo en presencia de altas concentraciones de BAP, estas estructuras fueron más resistentes a las bajas temperaturas que los propios meristemos Panis *et al.*, (1996).

➤ **Selección adecuada de la estrategia de deshidratación.**

Una metodología única de crioconservación que sea aplicable de manera exitosa aún no se ha desarrollado. Las investigaciones en este aspecto se centran en la selección de una estrategia adecuada para la deshidratación del material. (Sakai, 1995) distinguió cuatro estrategias posibles:

- ✓ Deshidratación osmótica previa a la congelación.
- ✓ Deshidratación por congelación lenta
- ✓ Deshidratación por vitrificación completa
- ✓ Deshidratación por secado al aire.

Las soluciones vitrificadoras no sólo reducen el contenido de agua en la célula sino que también penetran en los espacios intersticiales y contribuyen a inhibir la formación de los cristales de hielo en el medio intra- y extra-celular durante el enfriamiento rápido (Panis, 1995). Sin embargo, el problema fundamental con la vitrificación completa radica en la necesidad de controlar la duración del tiempo de exposición a las soluciones vitrificadoras ya que pueden causar daños por una deshidratación excesiva o por el efecto de toxicidad que imponen las altas concentraciones utilizadas (Sakai *et al.*, 1991b; Kohmura *et al.*, 1992; Reed, 2001).

Las primeras informaciones sobre la crioconservación en plantas basada en la vitrificación completa se informó por Uragami *et al.* (1989) para embriones somáticos de *Asparagus officinalis* y por Langis *et al.* (1989) para suspensiones celulares de *Brassica campestris*. Desde esa fecha hasta ahora, un amplio rango de materiales vegetales se han almacenado por esta estrategia, por ejemplo, ápices de *Ananas comosus* (González-Arno *et al.*, 1998), *Manihot esculenta* (Charoensub *et al.*, 1999), *Ipomoea batatas* (Pennycooke y Towill, 2000) y *Anigozanthos humilis* (Turner *et al.*, 2001), células nucleares de *Citrus sinensis* (Sakai *et al.*, 1990), protoplastos de *Secale cereale* (Langis y Steponkus, 1991) y ejes embriónicos de *Artocarpus heterophyllus* (Thammasiri, 1999). Diferentes soluciones vitrificadoras se han utilizado (Uragami *et al.*, 1989; Sakai *et al.*, 1990; Towill, 1990), pero la reconocida como plant vitrification solution número dos (30% de glicerol, 15% etilenglicol, 15% dimetilsulfóxido y 0,4 mol.L<sup>-1</sup> de sacarosa) ha sido la más aplicada (Sakai, 2000).

La Estrategia de deshidratación por congelación extracelular se basa en la disminución de la temperatura mediante un enfriamiento lento hasta una temperatura de precongelación, seguido de la inmersión rápida de las muestras en nitrógeno líquido (Kantha, 1985). Como se conoce, la reducción de la temperatura durante el enfriamiento lento conduce a la deshidratación de las células por la aparición de cristales de hielo extracelulares, que causa la disminución del volumen celular isotónico y produce el incremento de la concentración de solutos.

Generalmente una velocidad entre  $0,5-2^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  se considera como lenta aunque en ocasiones velocidades tan bajas como  $0,1^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  o tan rápidas como  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  se aplican también (Withers, 1980). Cuando se obtienen temperaturas entre  $-35$  ó  $-40^{\circ}\text{C}$ , el material se transfiere al nitrógeno líquido. Se asume que en estas condiciones toda el agua congelable abandonó la célula y el medio intracelular está altamente concentrado (Sakai, 2000).

La principal limitante para aplicar la estrategia de deshidratación por congelación extracelular en un amplio número de laboratorios a nivel internacional radica en que se necesita un equipamiento programable de la velocidad de enfriamiento con un alto costo, por lo que los centros de investigación-desarrollo con escasos recursos no pueden utilizar esta modalidad criogénica (Reed *et al.*, 2001).

Existen diferentes investigadores (Lecouteux *et al.*, 1991; Engelmann *et al.*, 1994; Panis, 1995; Engelmann *et al.*, 1997) que utilizan un procedimiento modificado para realizar el control de la velocidad de enfriamiento como el descrito por Withers y King (1980). Otros autores han empleado, aunque no siempre con éxito, procedimientos simples de enfriamiento para diferentes sistemas biológicos, en lo que han utilizado cajas de poli-estireno y recipientes con alcohol preenfriado que colocan en un congelador a ultra bajas temperaturas (Maddox *et al.*, 1983; Withers, 1985).

#### ➤ **Tratamientos crioprotectores.**

La mayoría de los tejidos vegetales hidratados, necesitan una especial protección química durante el ciclo de congelación-descongelación. Generalmente se emplean los tratamientos crioprotectores con sustancias de un grupo heterogéneo de compuestos que

tienen gran afinidad por el agua y que no resultan tóxicos al sistema en dependencia de su concentración (Chen y Kartha, 1986). Ellos pueden aplicarse mediante pre-cultivos en base sólida o líquida y sirven de medio de suspensión para las células y los tejidos durante la congelación.

Se distinguen dos categorías de sustancias crioprotectoras: penetrantes y no penetrantes (Panis, 1995). En el primer grupo se encuentran el dimetilsulfóxido, metanol y glicerol; y en el segundo están presentes los azúcares, alcoholes azucarados y aditivos de alta masa molecular. Sin embargo, en ocasiones una clara distinción entre los compuestos químicos penetrantes y los no penetrantes no se puede realizar, ya que dependen en gran medida de las variaciones en el tamaño de la célula y el tejido, de la temperatura de aplicación, del tiempo de exposición y de la permeabilidad propia del espécimen al crioprotector (Withers, 1980).

La aplicación de los crioprotectores penetrantes incrementa el volumen de la solución intracelular, evita una excesiva concentración de electrólitos tóxicos en la fase no congelable u aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática contribuyendo a la deshidratación. Adicionalmente, a los crioprotectores penetrantes se les atribuye la acción coligativa de disminuir el punto de fusión de la solución intracelular, factor decisivo para evitar la formación de cristales de hielo en el medio intracelular (Mazur, 1984).

Los compuestos no penetrantes actúan fundamentalmente como agentes osmóticos desde el medio externo y contribuyen a reducir la cantidad de agua intracelular posible a congelarse. Sin embargo, aun no existe una explicación convincente de cómo funcionan las sustancias crioprotectoras o dónde se encuentran los sitios críticos de protección (Panis, 1995).

Generalmente se han empleado con buenos resultados las mezclas de crioprotectores. Esto se debe a la utilidad que representa la combinación de los efectos penetrantes y no penetrantes, la estabilidad física de las mezclas a las bajas temperaturas con relación a la de un componente simple y la acción protectora ante la toxicidad de unos compuestos con respecto a otros (Kantha *et al.*, 1988). Sin embargo, la selección del tipo y la concentración de los agentes crioprotectores aún se realiza de manera empírica en

dependencia de la tolerancia de las células para cada material a crioconservar (Reed *et al.*, 2001).

➤ **Descongelación.**

La descongelación es bastante simple, pero ésta se considera de las más críticas durante la crioconservación. En las diferentes metodologías generalmente se realiza rápido, para ello los crioviales se colocan en un baño de maría a 35-40°C (Kartha, 1985). El objetivo fundamental es evitar la fusión de los microcristales de hielo formados durante la congelación conocido como fenómeno de re-cristalización (Mazur, 1984). Si llega a ocurrir tal fusión se pueden formar grandes cristales de hielo que dañarían la integridad celular.

➤ **Tratamientos de post-congelación.**

Esta etapa consiste en cultivar al material descongelado bajo condiciones que aseguren su óptima recuperación. En general, es muy prudente tomar todas las medidas para estabilizar el espécimen en esta etapa: incubación a niveles bajos de luz o en algunos casos en la completa oscuridad (Benson, 2000); atenuación del choque osmótico causado por una inmediata transferencia a un medio con bajo potencial osmótico mediante la sucesiva transferencia a medios con menos concentración (Schrijmakers y Van Iren, 1995); utilización de cambios de medios semi-sólidos sobre líquidos para mejorar el recrecimiento (Dussert *et al.*, 1998); y eliminación progresiva de las sustancias crioprotectoras mediante lavados (Gnanapragasam y Vasil, 1992).

➤ **Efecto del genotipo.**

Engelmann (2000) evidenció que una metodología de crioconservación funciona en rangos de respuesta a la temperatura del nitrógeno líquido en dependencia del genotipo y si se estimara conveniente mejorar la eficiencia del procedimiento para un genotipo elite entonces se justificaría la realización de ajustes al protocolo de crioconservación. Paulet *et al.* (1993), Cyr (1998) y Reed *et al.* (2001) plantean que el factor genotipo se necesita siempre tener en cuenta para validar cualquier protocolo de crioconservación. Incluso, Turner *et al.* (2001) demostraron que resultó eficiente utilizar primero una especie indicadora (en su caso *Anigozanthos viridis* que tenía una alta tasa de multiplicación *in vitro*) para optimizar el protocolo de crioconservación y después aplicarlo a otras especies relacionadas.

#### **2.8.4 Determinaciones analíticas como indicadores de los daños inducidos por la criopreservación en las membranas celulares.**

Durante la criopreservación, las membranas celulares de las células vegetales pueden dañarse producto de factores biofísicos y bioquímicos (Dumet y Benson, 2000). Los factores biofísicos están dados por la exposición de las células a las bajas temperaturas, la formación de cristales de hielo y una severa deshidratación durante la congelación y los factores bioquímicos fundamentalmente por la formación de radicales libres, desacoplamiento metabólico y peroxidación lipídica.

##### **➤ Factores biofísicos**

Para todas las células, Mazur (1970) propuso la hipótesis de dos factores de daño por congelación basado en los efectos biofísicos de la formación de los cristales de hielo y en los efectos dinámicos de la velocidad de enfriamiento. Al utilizar una velocidad de enfriamiento rápida aparecen cristales de hielo intracelulares de un tamaño considerable que causan daños irreversibles, y por lo tanto constituyen el primer factor de esta hipótesis.

El segundo factor se atribuye a la deshidratación causada por la formación de los cristales de hielo. Si se emplea una velocidad lenta de enfriamiento, la formación de los cristales de hielo se induce primero en el compartimiento extracelular, el daño se atribuye entonces a una extrema deshidratación osmótica (también denominada efecto de solución), provocada por la salida del agua hacia el exterior de la célula para compensar el déficit de vapor que produce el evento de la congelación (Steponkus y Webb, 1992).

La respuesta de las células a la congelación, depende de las propiedades de las membranas celulares. Los lípidos de las membranas sufren una transición de fase desde líquida-cristalina hasta gel. La coexistencia de ambas fases, en la estructura de las membranas, causa la pérdida de electrolitos y por lo tanto, las células mueren (Steponkus y Webb, 1992). Debido a que no todos los lípidos tienen la misma temperatura de transición de fase, la separación de las fases puede tener lugar, formando dominios ricos en fases en estado de gel. Durante el calentamiento, estos dominios pasarán a formar estructuras no-lamelares, lo cual causa la pérdida de electrolitos y la

muerte celular (Quinn, 1985). También, durante la exposición a las bajas temperaturas, las proteínas de las membranas se pueden inactivar (Usami *et al.*, 1995).

Como se conoce, la criopreservación exitosa durante una congelación lenta de las células vegetales con sustancias crioprotectoras puede ser posible, evitando la formación del hielo en las células con la nucleación en el medio extra-celular. Sin embargo, las membranas pueden sufrir daños por las fuerzas mecánicas de los cristales de hielo en crecimiento y su adhesión a la superficie de las membranas (Grout, 1995).

La etapa de deshidratación necesaria para evitar la formación de hielo intracelular, provoca el aumento de la concentración de solutos en las células y una fuerte plasmólisis de éstas (Towill, 1990). Los problemas asociados a las plasmólisis aumentan durante la congelación, cuando las células se desplasmolizan. Por ejemplo, la contracción osmótica conlleva a la formación de vesículas endocitóticas, lo cual provoca la lisis celular durante la expansión osmótica debido a que el material membranoso no está disponible rápidamente para facilitar la desplasmólisis. También, las membranas pueden sufrir fusiones cuando están en contacto cercano durante la plasmólisis (Steponkus y Webb, 1992).

➤ **Factores bioquímicos.**

Estos factores promueven varios cambios sub-letales como el desacoplamiento metabólico que conlleva a la producción de radicales libres tóxicos. Estas moléculas tienen electrones impares que causan daño por la extracción de electrones en macromoléculas esenciales como lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico. El acoplamiento metabólico estable y una protección antioxidante eficiente, bajo condiciones fisiológicas normales para las células, aseguran que los daños por los radicales libres no ocurran (Dumet y Benson, 2000).

El estrés a que está sujeto el material durante la criopreservación puede promover la producción de radicales libres (Benson, 2000). Los más importantes son el radical hidroxilo, el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. Estos radicales libres atacan la fracción lipídica de las membranas, lo que trae como resultado la formación de los peróxidos de lípidos, y éstos a su vez son inestables y forman productos tóxicos de la oxidación secundaria (Esterbauer *et al.*, 1988). Los productos de la peroxidación

lipídica son aldehídos muy citotóxicos, entre los más dañinos se encuentran el malondialdehído y el hidroxí-2-nonenal (Adams *et al.*, 1999).

Existen evidencias que sugieren la presencia de los radicales libres mediados por el estrés oxidativo durante la aplicación de protocolos de criopreservación, desecación y manipulación en el cultivo de tejidos (Hendry, 1993; Bailey *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1995; Benson, 2000). Esto se ejemplifica por la detección directa (Magill *et al.*, 1994) e indirecta (Benson y Withers, 1987; Benson y Noronha-Dutra, 1988) de los radicales libres en células vegetales que han sufrido tratamientos de congelación, criopreservación y desecación. También, se han detectado productos de peroxidación lipídica secundaria en suspensiones celulares (Benson *et al.*, 1992, 1995) y en tejidos estresados por el cultivo *in vitro* (Robertson *et al.*, 1995; Benson y Roubelakis-Angelakis, 1994).

Debido a la pérdida de agua, los componentes celulares se concentran y se convierten en agentes tóxicos, coagulan o se precipitan. Varios trabajos sobre el estudio del comportamiento de las proteínas durante la deshidratación por la congelación convergen en que las enzimas solubles, las proteínas asociadas a la membrana y al citoesqueleto, y las subunidades ribosomales se encuentran sujetas a cambios con el incremento de los solutos celulares (Grout, 1995; Guy, 1999).

### **2.8.5 Importancia de las técnicas analíticas para elucidar las bases biofísicas y bioquímicas de los daños inducidos por la criopreservación.**

Como se ha mencionado, los daños a la membrana durante la congelación-descongelación son bastante amplios; por lo tanto, un estudio mediante técnicas analíticas ayudará a comprender y elucidar las bases biofísicas y bioquímicas de los daños inducidos por la criopreservación. Sin embargo, hasta la fecha las investigaciones que se realizan no son numerosas. Algunas que se ejecutan son caras y complejas para detectar y visualizar en el “tiempo real” los daños celulares, por lo que en la mayoría de las investigaciones hacen uso de las técnicas analíticas indirectas (Dumet y Benson, 2000).

Entre las técnicas analíticas indirectas asociadas al estrés de la deshidratación y las bajas temperaturas, se encuentra la determinación de la pérdida de electrolitos (Hincha y Schmitt, 1992; Tetteroo, 1996; Sun, 1999), la determinación de la peroxidación lipídica (Meir *et al.*, 1992; Du y Bramlage, 1995; Shewfelt y Purvis, 1995; Zhuang *et al.*, 1995; Ait Barka *et al.*, 2000), y las proteínas (Thomashow, 1999; Sun *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 2002).

La pérdida de electrolitos, se ha utilizado para estudiar la sensibilidad a la desecación y al frío en semillas recalcitrantes de *Quercus rubra* (Sun, 1999). Además, se ha usado para evaluar los daños en las membranas por las bajas temperaturas a diferentes genotipos de plantas de *Coffea* sp. (Scotti *et al.*, 2003).

Los cambios de peroxidación lipídica por su parte, traen asociado la formación de aldehídos tóxicos durante una oxidación secundaria (Esterbauer *et al.*, 1988; Cassells y Curry, 2001; Gaspar *et al.*, 2002). Entre los aldehídos más citotóxicos se encuentra: el malondialdehído (Adams *et al.*, 1999).

Otras investigaciones involucran también cambios en el metabolismo de las proteínas, los cuales pueden resultar en la adquisición de tolerancia al proceso de criopreservación (Thierry *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999). Además, se ha informado que las plantas poseen proteínas anti-congelantes y son potentes inhibidores de los cristales de hielo (Clarke *et al.*, 2002).

#### **2.8.6 Estabilidad genética del material criopreservado al nivel fenotípico.**

Recientemente, Harding (2004) manifestó que el concepto de estabilidad genética aún no tiene una correcta definición científica cuando se refiere a juzgar la estabilidad de las plantas después de la criopreservación. Este autor propone el término de Criobionómica a la ciencia biológica que estudia el comportamiento de los organismos criopreservados y su hábitat después de su reintroducción a las condiciones naturales del medio ambiente. Esto se debe básicamente a que existe poca información sobre los efectos de la criopreservación en la estabilidad genética del material vegetal, y las diferentes técnicas utilizadas para medir la estabilidad genética poseen algunas limitaciones lo que hace muy difícil su evaluación acertada (Engelmann, 2000; Turner *et al.*, 2001; Helliot

*et al.*, 2002; Harding, 2004). Además, Harding (2004) plantea que son necesarias las investigaciones sobre la estabilidad genética de las plantas regeneradas a partir del material crioconservado para que se inicien las bases aceptables de un consenso internacional donde sea aprobada su liberación y re-introducción en el medio ambiente y su uso en las diferentes aplicaciones tecnológicas.

Hasta la fecha, se han realizado aproximadamente 100 investigaciones relacionadas con la estabilidad genética de las plantas después de la crioconservación, de ellas 45 se refieren a las técnicas que consideran la estabilidad a nivel fenotípico. Fukai *et al.* (1994) encontraron modificaciones fenotípicas que afectaron el color en las flores del crisantemo después de la regeneración de ápices crioconservados. Sin embargo, la mayoría de los estudios indican que las plantas muestran una normalidad morfológica después de la crioconservación.

Bajaj (1983) informó que plantas de yuca que crecieron en campo obtenidas de material crioconservado fueron fenotípicamente estables. Plantas regeneradas *in vitro* a partir de ápices de *Prunus* mostraron un desarrollo competente normal y crecieron igual al progenitor (Helliot *et al.*, 2002). No se observaron diferencias en el desarrollo de los caracteres morfológicos entre plantas derivadas de un control o ápices crioconservados de caña de azúcar (Paulet *et al.*, 1993), café (Dussert *et al.*, 1998), arroz (Al-Forkan *et al.*, 2001), kiwi (Wu *et al.*, 2001), uva (Zhao *et al.*, 2001) y *Eucalyptus* (Blakesley y Kiernan, 2001). Además, la crioconservación se aplicó a ápices de papa obtenidos de un amplio rango de genotipos (diploides, tetraploides y hexaploides) y todas las plantas fueron fenotípicamente normales y produjeron flores y tubérculos (Benson *et al.*, 1998).

En el caso de material embriogénico, Engelmann (1991b) encontró que árboles de palma de aceite formados de embriones somáticos crioconservados mostraron un desarrollo vegetativo y floral comparables con las plantas controles. Plantas regeneradas de embriones somáticos de naranja dulce que presentaron supervivencia después del nitrógeno líquido no mostraron anomalías fenotípicas (Marín *et al.*, 1993), y no se observaron cambios en cultivos de embriones somáticos de pino después de los tratamientos crioprotectores y la crioconservación (Aronen *et al.*, 1999). Park *et al.* (1998) encontró un alto grado de estabilidad en los caracteres morfológicos de plantas

regeneradas obtenidas de clones embriogénicos de pino blanco después de tres y cuatro años almacenados en nitrógeno líquido.

Sin embargo, la mayoría de los estudios fenotípicos carecen de exámenes detallados cuando se comparan las plantas controles y las obtenidas del material criopreservado, y se caracterizan como análisis cualitativos sin realizar análisis estadísticos de los aspectos morfológicos (Harding y Staines, 2001). La aplicación de estudios biométricos en conjunto con los caracteres fenotípicos se han utilizado por pocos autores para evaluar las variaciones genéticas, aunque éstos son más indicadores de los cambios fenotípicos como resultado de las interacciones genómicas totales y de los cambios temporales en la expresión génica (Harding, 2004).

### **3. Materiales y métodos**

La presente investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), adscrito a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), Santa Clara, Cuba. El mismo se llevó a cabo durante el período comprendido entre diciembre del 2004 a diciembre de 2005.

#### **Técnicas y procedimientos generales de trabajo.**

##### **Material vegetal.**

Como material vegetal fueron utilizadas plantas *in vitro* del cv. CEMSA ¾ en el segundo subcultivo de la fase de multiplicación. La inducción de los callos con estructuras embriogénicas se realizó a partir de yemas axilares de 0.1- 0.3 mm, en el medio de cultivo propuesto por *Escalant et. al.*, (1994)

##### **Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas (SCE).**

El establecimiento de SCE se realizó a partir de embriones somáticos obtenidos de callos con estructuras embriogénicas, provenientes de domos meristemáticos de las yemas axilares. Para ello se emplearon Erlenmeyers de 10 mL de volumen total que contenían cada uno 2.0 mL de medio de cultivo compuesto por ½ de las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), vitaminas MS, 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-ácido diclorofenoxiacético, 10 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y pH 5.7 (este medio en lo adelante se identificará por ZZ), y se inocularon 0.1 gramos de masa fresca (gMF) de embriones somáticos según Santos *et al* (2002) en el cv. “Navolean”.

Los Erlenmeyers se colocaron en un agitador orbital modelo *INFORS (HT)*, a una velocidad de 90 r.p.m., la temperatura de cultivo fue de 27± 2.0°C y la iluminación se suministró mediante tubos fluorescentes con régimen de 16 h de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 62-68 μmol. m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Durante esta etapa los cambios de medio de cultivo se realizaron cada 3 días y consistieron en la renovación del 50% del medio de cultivo tomado de la parte superior, lo cual permitió eliminar la presencia de células y agregados no embriogénicos.

La calidad de las suspensiones fue determinada por el tipo de células predominantes y la aparición o no de agregados embriogénicos. Los cultivos celulares fueron tamizados a través de mallas metálicas con un diámetro de 500µm. Estos filtrados homogéneos que incluían agregados celulares embriogénicos (ACE) menores de 500 µm constituyeron las suspensiones celulares embriogénicas utilizadas en los diferentes estudios de criopreservación. Una vez establecidas las suspensiones celulares, las mismas se multiplicaron a una densidad de 3.0% del volumen de células sedimentadas (VCS).

Los experimentos de criopreservación se iniciaron cuando las SCE se encontraban en crecimiento exponencial (7 a 10 días después del último subcultivo) y con 100% de vitalidad celular. Las mismas se mantuvieron en medio de cultivo ZZ en estado líquido.

### **Instrumental**

La esterilización de los instrumentales (filtros, placas de Petri, pipetas, espátulas, pipetas Pasteur, platos) utilizados en la manipulación de las suspensiones celulares, se realizó en estufa a 180°C durante dos horas. Las pinzas y los bisturís se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% (p/v) durante 15 minutos antes de ser utilizados (Agramontes *et al.*, 1993). Todos los Erlenmeyers utilizados en los cultivos en suspensión, así como las puntas de pipetas SOCOREX fueron esterilizados en autoclaves a 121°C y 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión durante 40 minutos. Para la manipulación de las suspensiones celulares se utilizaron pipetas de vidrio de 5 y 10 mL de volumen y una pipeta automática *PIPETBOY* (TECNOMARA). Las operaciones de inoculación, transferencia y manipulación del material vegetal fueron realizadas en una cabina de flujo laminar.

### **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión. El tiempo de esterilización estuvo en dependencia del volumen de medio de cultivo, según SIGMA (1991). El pH fue ajustado con el uso del ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M y/o el hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M previo a la esterilización del medio de cultivo. En el caso del empleo de medio de cultivo semisólido, se utilizaron frascos de vidrio de 250 mL de capacidad total, los mismos contenían 30 mL de medio de cultivo. Para la formación y maduración de los embriones, se usaron placas de Petri de 60 mm de

diámetro, las cuales contenían 20 mL de medio de cultivo. En ambos casos el medio de cultivo semisólido fue gelificado con phytigel a razón de 2.3g.L<sup>-1</sup>.

### **Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron con tres repeticiones y se aplicó una lectura de observaciones completamente aleatoria. Para el análisis estadístico de los resultados de cada experimento se realizaron análisis de varianza simple y como prueba de comparación de medias, la de rangos múltiples de Duncan. El procesamiento estadístico de las variables en cada estudio fue posible a través del programa estadístico computacional StatGraphics Plus ver. 4.1 con aplicación para Windows (1997). El nivel de significación fijado para todas las pruebas fue del 95%, o sea,  $p < 0.05$ . Los datos se transformaron para el análisis del porcentaje de agregados vivos según  $x = 2 \arcsin ((x/100)^{0.5})$  y el número de agregados totales y plantas regeneradas, de acuerdo con la fórmula  $x = (0.5 + x)^{0.5}$ .

### **Técnicas y procedimientos generales para los experimentos.**

#### **Precultivo con sacarosa**

Las suspensiones celulares embriogénicas son precultivadas durante 24 horas en medio de cultivo ZZ en estado líquido, complementado con 180 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa. Transcurrido este tiempo se extrajeron los agregados celulares embriogénicos y se inició el proceso de crioprotección con dimetilsulfóxido (DMSO).

#### **Crioprotección**

La crioprotección se realizó con soluciones de dimetilsulfóxido. Estas soluciones se prepararon en la cabina de flujo laminar tomando volúmenes del de DMSO de acuerdo a la concentración deseada y se enrasaron con 100 mL de medio ZZ con 180 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa. La adición de las soluciones y los tiempos de inmersión se realizaron según los procedimientos descritos por Panis y Thinh (2001) en la Guía técnica del INIBAP. Se utilizaron tubos graduados de centrifuga de 15 mL de volumen total y se adicionó 2.5 mL de ACE.

#### **Almacenamiento**

Se prepararon 10 criotubos con 1 mL cada uno y se marcaron con criomarcadores para identificar las muestras. Posteriormente los criotubos se sellaron con cinta de teflón y se preparó un criotubo control con 0.5 mL de medio ZZ con 180 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa más 0.5 mL de solución de DMSO. En su interior se colocó el sensor del termómetro digital, Modelo NTS 912.

Seguidamente los criotubos se colocaron en recipientes tipo Nalgene<sup>TM</sup> cerrados con 250 mL de isopropanol al 95% y se colocaron en Freezer de -85°C para que alcanzaran la temperatura de subenfriamiento (-40°C). Cuando se alcanzó esta temperatura se sacaron los criotubos y se colocaron en sus contenedores con tapas y se realizó la inmersión directa en nitrógeno líquido (-196°C).

### **Descongelación**

Para la descongelación los criotubos se sumergieron en Baño de María a 40°C de temperatura durante aproximadamente dos minutos, hasta derretirse la mayor parte del hielo (Panis y Thinh, 2001).

### **Recuperación**

A las suspensiones descongeladas se les retiró toda la solución crioprotectora y se lavaron las células con medio de cultivo ZZ. Los agregados celulares se colocaron sobre mallas en medio de cultivo para favorecer la difusión y eliminación progresiva de los restos de solución crioprotectora.

La recuperación de las SCE crioconservadas se evaluó a los 30 días en medios de cultivo ZZ en estado líquido y semisólido, y medios semisólido de formación de embriones (FE). Este último estaba compuesto por ½ de las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), vitaminas MS, 100mg.L<sup>-1</sup> de Myo-Inositol, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y pH 5.8. Las SCE crioconservadas fueron colocadas en ambos medios de cultivo y se ubicaron en cámaras de cultivo con 27±2°C de temperatura y en oscuridad total.

## **Técnicas y procedimientos específicos por experimentos**

### 3.1. Influencia del precultivo con alta concentración de sacarosa en la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas.

Para este estudio se utilizaron SCE precultivadas con sacarosa y SCE no precultivadas. La crioprotección de las mismas se efectuó en tubos graduados que contenían 2.5 mL de ACE sedimentados y se utilizó 15% de DMSO según protocolo descrito por Panis y Tinh (2001).

Los tratamientos quedaron conformados como se observa en la tabla 1 y se dispuso de 80 criotubos por tratamiento estudiado.

**Tabla 1.** Tratamientos estudiados para la crioconservación de SCE de CEMSA <sup>3/4</sup>.

Tratamientos	Concentración de sacarosa (g.L <sup>-1</sup> )
1	0
2	180

Después de dos semanas en nitrógeno líquido se evaluó la vitalidad de las SCE inmediatamente después de la descongelación. Para ello se observaron las mismas al microscópico óptico (AXIOSKOP) con excitación a 450-490 nm, fluorescencia a 510-520 nm y se determinó la vitalidad celular con el uso de diacetato de fluoresceína (DAF) (Widholm, 1972). El conteo de los ACE vivos se efectuó en cámara de Fuch-Rosental de 0.2 mm de profundidad. La vitalidad celular fue expresada por el porcentaje de agregados celulares vivos. El número de agregados celulares se determinó por la siguiente ecuación matemática (Ceballos, 2000).

Número de agregados celulares. mL<sup>-1</sup> =  $\frac{\text{Número de agregados contados}}{\text{Número de cuadros contados}} \times \text{F.C} \times \text{F.D}$

Número de cuadros contados

Donde: FC= Factor de la cámara (5x10<sup>3</sup>) y FD= Factor de dilución.

Se determinó además la capacidad de recuperación de las suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas. Para ello se utilizó el medio de cultivo ZZ en estado líquido en Erlenmeyer de 50 mL de capacidad y semisólido en placas Petri de 60 mm de diámetro. Se adicionó el contenido de un criotubo por Erlenmeyer de 50 mL y en el medio de cultivo semisólido se procedió de la siguiente forma: en platos metálicos estériles se colocó papel de filtro, encima del cual se pusieron mallas de nylon de 1.0

cm<sup>2</sup>. En tubos cónicos de 15 mL se ajustó el 3% de volumen de células sedimentadas y con una micropipeta (SOCOREX) de 1 000 µL con puntas azules cortadas, se homogenizó la suspensión y se depositaron 150 µL de ACE sobre la malla de nylon, la que retuvo las células y el papel de filtro absorbió el exceso de medio de cultivo. Cada una de estas mallas de nylon representó una repetición y se colocaron cinco mallas por placa de Petri. Se utilizaron diez repeticiones para cada tratamiento.

Las placas de Petri fueron selladas con *Parafilm*<sup>®</sup> y colocadas en oscuridad total a una temperatura de 27±2.0°C. Se realizaron observaciones a simple vista a partir del decimoquinto día de cultivo para estimar el crecimiento celular.

### **3.2. Efecto del precultivo a baja temperatura en la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas.**

Teniendo como precedente ensayos preliminares donde se evaluó la vitalidad de las SCE después de 24 horas en cámara de crecimiento a 4°C de temperatura, donde la vitalidad de los agregados celulares se mantuvo alta (100%). Se diseñó un experimento para determinar la influencia del tiempo de cultivo a baja temperatura en el preacondicionamiento de las suspensiones celulares embriogénicas a crioconservar. Se establecieron cuatro tiempos de cultivo a 4°C de temperatura, previo al proceso de crioprotección con DMSO. En la tabla 3 se muestran los tratamientos estudiados.

**Tabla 2.** Tratamientos estudiados durante el precultivo a 4 °C de temperatura.

<b>Tratamientos</b>	<b>Días de precultivo a 4°C</b>
1	1
2	2
3	3
4	4
5	Control sin precultivo a 4°C

Después de dos semanas en nitrógeno líquido e inmediatamente después de la descongelación se evaluó la vitalidad de las SCE crioconservadas, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el experimento anterior.

Considerando la importancia que tiene la determinación de la supervivencia dada por la regeneración, para cualquier metodología de criopreservación la recuperación de las SCE criopreservados se determinó evaluando el crecimiento celular en medio de cultivo ZZ en estado líquido y semisólido. Además se utilizó el medio de cultivo para la formación de embriones somáticos.

Se realizaron observaciones a simple vista a partir de los 15 días para estimar el crecimiento celular y la formación de embriones somáticos.

### **3.3. Influencia de la concentración de DMSO en la crioprotección de suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas.**

Teniendo en cuenta los resultados del experimento anterior se efectuó la crioprotección de SCE con diferentes concentraciones de DMSO (Tabla3). El objetivo del experimento fue determinar la concentración óptima de DMSO que proporcione la crioprotección de las SCE criopreservadas, dada por el porcentaje de ACE vivos, inmediatamente después de la descongelación. Este procedimiento se efectuó de igual manera a los experimentos anteriores.

**Tabla 3.** Diferentes concentraciones de DMSO estudiadas en la crioprotección de las suspensiones celulares embriogénicas.

<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración de DMSO (%)</b>
2	5
3	10
4	15
5	20
Control	0

La capacidad de recuperación de las SCE criopreservadas se realizó colocando los agregados celulares sobre mallas en medio de cultivo semisólido ZZ y de formación de embriones (FE) a la oscuridad. Transcurrido este período de cultivo se evaluó el crecimiento celular en ZZ y la formación de embriones somáticos.

### **3.4. Evaluación de la influencia del precultivo a baja temperatura y la crioprotección con DMSO en la germinación de los embriones somáticos obtenidos a partir de suspensiones celulares crioconservadas.**

La germinación de los embriones somáticos constituye uno de los pasos más importantes para validar cualquier proceso embriogénico. Para ello los embriones somáticos formados a partir de las SCE crioconservadas en los experimentos anteriores, fueron colocados inicialmente en el medio de cultivo de maduración, propuesto por Gómez *et al.* (2000) y posteriormente se colocaron 10 grupos de embriones somáticos por frascos (250 mL de capacidad total) en 30 mL de medio de cultivo de germinación propuesto por Gómez *et al.* (2000), el cual contenía las sales MS, las vitaminas MS, 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP, 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de AIA, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mioinositol, 0.01 mg.L<sup>-1</sup> de Biobrás-6, y 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa. El pH fue ajustado a 5.8 antes de la esterilización y el medio de cultivo se gelificó con 2.3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel.

Las condiciones de cultivo fueron en cámara de crecimiento con luz artificial con fotoperíodo de 16 horas luz y densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 62-68  $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , empleando lámparas fluorescentes de 40 W del tipo Full Spectrum y se mantuvo una temperatura de  $27\pm 2.0^\circ\text{C}$ . Los grupos contenían de 4 a 5 embriones y se establecieron 20 réplicas (frascos de vidrio).

### **3.5. Evaluación en casa de cultivo de las plantas obtenidas a partir de suspensiones celulares crioconservadas.**

Para estudiar el comportamiento *ex vitro* de una población de plantas obtenidas a partir de SCE crioconservadas, fueron llevadas a la fase de aclimatización un total de 500 plantas. Se utilizaron como control 500 plantas obtenidas a partir de SCE no crioconservadas.

Esta fase se desarrolló según la metodología propuesta por Pérez *et al.*, (1999) en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán), que logra una reducción de la intensidad luminosa del 70%. El riego se realizó por microaspersión mediante el sistema microjet con una frecuencia de seis riegos al día y una duración de dos minutos cada uno, con esta frecuencia se garantizó una humedad relativa del 85-90%. Se utilizaron bandejas de polieturano con 70 orificios y sustrato artificial formado por una mezcla de casting (80%) y zeolita (20%).

A los 10 días de la siembra se determinó el porcentaje de supervivencia de las plantas obtenidas a partir de SCE criopreservadas con respecto a las plantas procedentes de SCE no criopreservadas.

Se evaluó la supervivencia de las plantas a los 10 días de sembradas en casa de cultivo. Después de 45 días se realizaron observaciones en ambas poblaciones con el objetivo de detectar la presencia de las principales y más frecuentes variaciones somaclonales o cambios fenotípicos descritos por Sandoval *et al.* (1997) en esta especie.

#### 4. Resultados y Discusión

##### 4.1. Influencia del precultivo con alta concentración de sacarosa en la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas.

**El precultivo con alta concentración de sacarosa afectó considerablemente el porcentaje de vitalidad de las SCE crioconservadas del cultivar CEMSA ¾. Como se observa en la tabla 4 se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las SCE precultivadas y no precultivadas.**

**Tabla 4.** Comportamiento de la vitalidad celular de las SCE crioconsevadas del cultivar. CEMSA ¾.

Tratamientos	Vitalidad de los agregados (%)
0 g.L <sup>-1</sup> sacarosa	80.5 a
180 g.L <sup>-1</sup> sacarosa	35.2 b
ESx	0.26

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $P < 0.05$ , según Duncan

La disminución en el porcentaje de vitalidad de las SCE crioconservadas por el efecto del precultivo con alta concentración de sacarosa puede estar dada por una deshidratación excesiva de los agregados celulares durante este proceso. Sin embargo (Côte, 2000) recomienda este precultivo en SCE derivadas de las flores masculinas inmaduras.

Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con los alcanzados por Panis *et al.* (2000), en estudio realizado para la crioconservación de suspensiones celulares de plátanos derivadas de scalp, donde el precultivo con sacarosa tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de las células congeladas, señalando que la baja supervivencia pudo atribuirse a la acumulación intracelular de sacarosa, la cual es incrementada por la deshidratación que ocurre durante la congelación.

De acuerdo al análisis anterior parece ser que nuestras SCE derivadas de callos con estructuras embriogénicas, provenientes de domos meristemáticos de yemas axilares,

tienen similares características a las obtenidas de scalp y no requieren el precultivo con altas concentraciones de sacarosa.

Un efecto negativo del precultivo con sacarosa fue reportado por Danso y Ford-Lloyd, (2003). Ellos obtuvieron una reducción en la regeneración de segmentos nodales encapsulados de accesiones de yuca (*Monihot esculenta Crantz*) cuando incrementaron la concentración de sacarosa en el medio de polimerización de Cloruro de Calcio.

Niino *et al.*, (2000 a), obtuvieron resultados favorables al utilizar el precultivo con 35 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa en el preacondicionamiento de ápices de *Solemostemon rotundifolius* logrando mejorar la regeneración hasta un 85%.

Martínez *et al.*, (2004) recomiendan realizar el preacondicionamiento a la criopreservación de ápices de piña (*Ananas comosus L. Merr*) en un medio de cultivo semisólido con 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa

Acosta, (2006) obtuvo ápices del híbrido de papaya IBP 42-99, morfológicamente más uniformes para la criopreservación con un precultivo en un medio con 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa durante 14 días.

La recuperación de los ACE criopreservados, a pesar de observarse vitalidad celular inmediatamente después de la descongelación no fue posible el crecimiento celular en ninguno de los medios de cultivo utilizados. Después de 15 días se observó oscurecimiento en las SCE criopreservadas. Estos resultados demuestran que no hay correspondencia entre la vitalidad celular determinada después de la descongelación y la recuperación del crecimiento celular de la SCE criopreservadas, en medio de cultivo ZZ en estado líquido y semisólido. Panis *et al.*, 2000, en estudio realizado en la criopreservación de SCE de bananos obtuvo resultados similares, señalando que no existe correspondencia entre la recuperación celular después de la congelación y una vitalidad del 25%, observada inmediatamente después de la descongelación.

Podemos concluir según los resultados obtenidos en este experimento que al parecer los efectos del precultivo con alta concentración de sacarosa en SCE están determinados por el material inicial de origen de las SCE.

#### 4.2. Efecto del precultivo a baja temperatura en la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas.

En este experimento se evidencia que el precultivo a 4° C de temperatura no proporciona un incremento de la vitalidad celular de las SCE crioconservadas. En la tabla 5 se observa que el mayor porcentaje de vitalidad celular se obtiene en las SCE no precultivadas, sin diferencias estadísticas con las precultivadas durante 2 días. El crecimiento celular en medio de cultivo ZZ en estado líquido y semisólido no se produjo en ninguno de los tratamientos estudiados, sin embargo, si ocurrió la formación de embriones somáticos en las SCE crioconservadas correspondientes a los tratamientos 1, 2 y el control.

**Tabla 5.** Influencia de los días de precultivo a 4°C en la vitalidad y recuperación de ACE crioconservados.

Tratamientos	Vitalidad de los ACE (%)	Crecimiento celular en medio semisólido de FE
1 día de precultivo a 4°C + 15 % DMSO	61,95 b	+++
2 días de precultivo a 4°C + 15 % DMSO	76,46 a	+++
3 días de precultivo a 4°C + 15 % DMSO	43,85 c	---
4 días de precultivo a 4°C + 15 % DMSO	33,18 d	---
Precultivo con 15% DMSO (Control)	79.3 a	+++
ESx	0.1959	

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $P < 0.05$  según Duncan

#### Leyenda

(FE) se refiere al medio de cultivo de formación de embriones somáticos.

(+++) Refiere la formación de embriones somáticos.

(---) se refiere a la no formación de embriones somáticos.

Niino *et al.* (2000) utilizan precultivo a 5° C de temperatura para precondicionar plantas *in vitro* de crisantemo y obtienen altos porcentajes de regeneración después del período de criopreservación.

La respuesta de las SCE al precultivo a baja temperatura puede estar dada por las características de los ACE de las suspensiones celulares de CEMSA<sup>3/4</sup>. El origen del material de inicio de la suspensión y el genotipo pueden ser dos de los factores determinantes en el resultado.

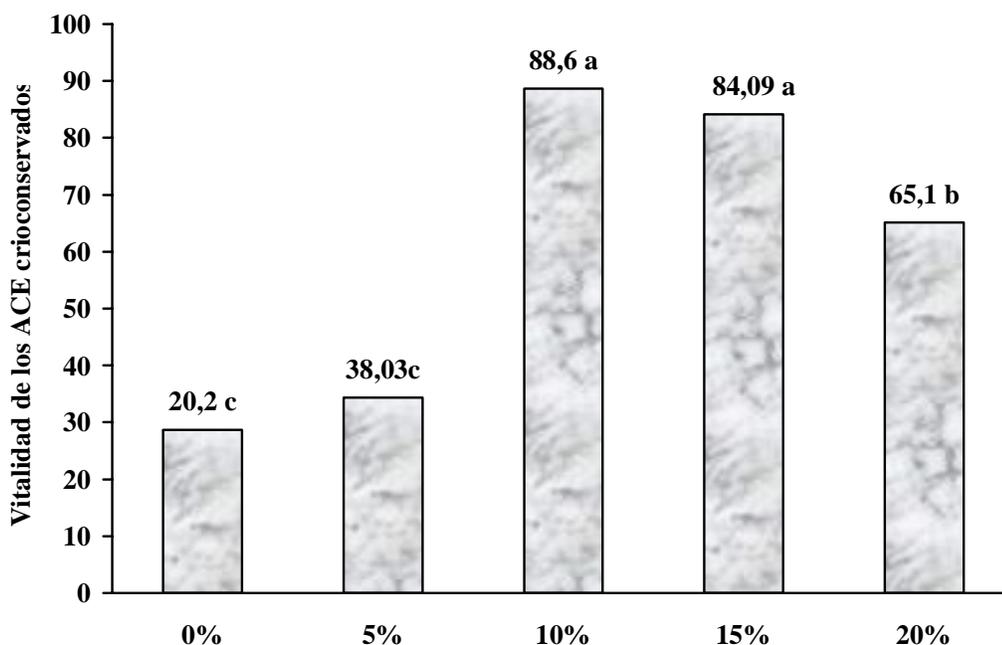
Criterio similar emitieron Keller *et al.*, (2005), quienes después de realizar un análisis de los materiales vegetales existentes en el Banco de Germoplasma de Gatersleben, consideraron que el éxito de la criopreservación de ajo es dependiente de los genotipos y la fuente del explante.

Los resultados por efecto del precultivo a baja temperatura dentro de la metodología de criopreservación que se desarrolla para SCE derivadas de callos con estructuras embriogénicas, provenientes de domos meristemáticos de yemas axilares según los porcentajes de vitalidad obtenidos indican que se puede valorar la utilización del precultivo durante 2 días a 4°C de SCE para garantizar una alta vitalidad de los ACE criopreservados.

#### **4.3. Influencia de la concentración de DMSO en la crioprotección de suspensiones celulares embriogénicas.**

La selección del tipo y la concentración de los agentes crioprotectores aún se realiza de forma empírica en dependencia de la tolerancia de las células para cada material a criopreservar (Reed *et al.*, 2001).

Como se observa en la figura 1, el mejor porcentaje de vitalidad se obtuvo cuando las SCE fueron crioprotectidas con 10% de DMSO, sin diferencias significativas con la concentración de 15%.



\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $P < 0.05$  según Duncan

**Figura 1.** Influencia de la concentración de DMSO en la vitalidad de las SCE criopreservadas de CEMSA  $\frac{3}{4}$ , ( $ESx = 0,1421$ ).

Es evidente la necesidad del uso del crioprotector y su efecto positivo en el proceso de criopreservación de SCE de CEMSA  $\frac{3}{4}$ . El empleo de concentraciones de 10 y 15% de DMSO incrementó el porcentaje de vitalidad de la SCE criopreservadas. El problema fundamental radica en la necesidad de controlar la duración del tiempo de exposición a las soluciones crioprotectoras ya que pueden causar daños por una deshidratación excesiva o por el efecto de toxicidad que imponen las altas concentraciones utilizadas (Sakai *et al.*, 1991b; Kohmura *et al.*, 1992; Reed, 2001).

Panis y Thinh, (2001) reportan el uso de dimetilsulfóxido en la mayoría de los protocolos de criopreservación del género *Musa*

Aunque el mecanismo de crioprotección del dimetilsulfóxido a las ultra-bajas temperaturas no está claro aún, se reconoce que está relacionado con las propiedades coligativas de este compuesto penetrante. Se conoce además que el DMSO puede

modificar la estructura del agua mediante la formación de puentes de hidrógeno y promover la ocurrencia de eventos físicos que eviten la cristalización del agua a bajas temperaturas (Frank, 2003).

Finkle *et al.*, 1985, clasificó el modo de acción del dimetilsulfóxido (DMSO) en la categoría de sustancia crioprotectora penetrante; no sólo puede reducir el contenido de agua en la célula sino que también puede penetrar en los espacios intersticiales y contribuir a inhibir la formación de los cristales de hielo en el medio intra- y extracelular durante el enfriamiento rápido. Como agente penetrante en las células, evita una concentración excesiva de electrolitos tóxicos en la solución celular no-congelada.

Anchordoguy *et al.* (1991), plantearon que el dimetilsulfóxido presenta un mecanismo no-coligativo de protección, el cual involucra una interacción iónica entre su oxígeno y las bicapas de los fosfolípidos, incrementando la estabilidad de las membranas durante la congelación-descongelación.

Su acción directa con los cristales de hielo formados es la de disminuir el punto de congelación en equilibrio de la solución según su concentración molar (McGann y Walterson, 1987; Kinoshita *et al.*, 2001).

En la literatura consultada se pudo apreciar que el DMSO es utilizado ampliamente por los investigadores para la protección de las células y tejidos vegetales a ultra-bajas temperaturas. Engelmann (2000) recomienda su uso como componente de una mezcla crioprotectora y no de manera individual.

Rodríguez, (2006) señaló que las técnicas de congelación más extendidas utilizan DMSO como crioprotector para optimizar la viabilidad y funcionalidad de las células reduciendo la proporción de agua congelada y la deshidratación intracelular durante el proceso de congelación.

En relación a la recuperación, no se produjo el crecimiento celular en el medio de multiplicación ZZ (líquido y semisólido), en las concentraciones de DMSO estudiadas, esto puede estar dado por la segregación de sustancias tóxicas de los agregados muertos

al medio de cultivo inhibiendo el crecimiento celular. Estos resultados se corroboran con los planteados por Panis *et al.*, (2002), quienes informaron que no existe correspondencia entre la vitalidad observada después de la descongelación y el crecimiento celular de los ACE criopreservados.

Para cualquier protocolo de criopreservación, la recuperación del material congelado es de vital importancia, una vez que se logre el recrecimiento del material vegetal será exitoso dicho protocolo y en ese momento se podrá hablar de una metodología de criopreservación. En tal sentido, (Dumet y Benson, 2000; Reinhoud *et al.*, 2000) señalaron la necesidad de precisar las causas de los daños ocasionados a las membranas celulares durante el proceso de criopreservación mediante técnicas analíticas que permitan elucidar las bases biofísicas y bioquímicas de esos daños. Esto contribuye a proponer estrategias novedosas para desarrollar métodos de criopreservación mejorados

**Tabla 6.** Comportamiento del crecimiento celular de suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas de CEMSA <sup>3/4</sup>.

<b>Concentración de DMSO</b>	<b>Crecimiento celular</b>
<b>(%)</b>	<b>Medio semisólido de FE</b>
5	---
10	+++
15	+++
20	---
Control	---

**Leyenda**

(FE) se refiere al medio de cultivo de formación de embriones somáticos.

(+++) *refiere la formación de embriones somáticos.*

(---) se refiere a la no formación de embriones somáticos.

Como se muestra en la tabla 6, la recuperación de los SCE criopreservadas solo fue posible en los tratamientos donde se utilizó 10% y 15% de DMSO en la crioprotección, al utilizar el medio de FE en estado semisólido. Se observaron a través del microscopio óptico masas de proembriones y algunos embriones somáticos aislados y con el

transcurso del tiempo de cultivo se produjo un incremento en la formación y diferenciación de los embriones somáticos según muestra en la figura 2.



**Figura 2:** Embriones somáticos formados a partir de SCE criopreservadas del cultivar CEMSA 3/4.

Los embriones somáticos formados a partir de SCE criopreservadas con 10 y 15% de DMSO fueron colocadas en medio de maduración y posteriormente en medio de cultivo de germinación para evaluar la capacidad de germinación y formación de plantas completas

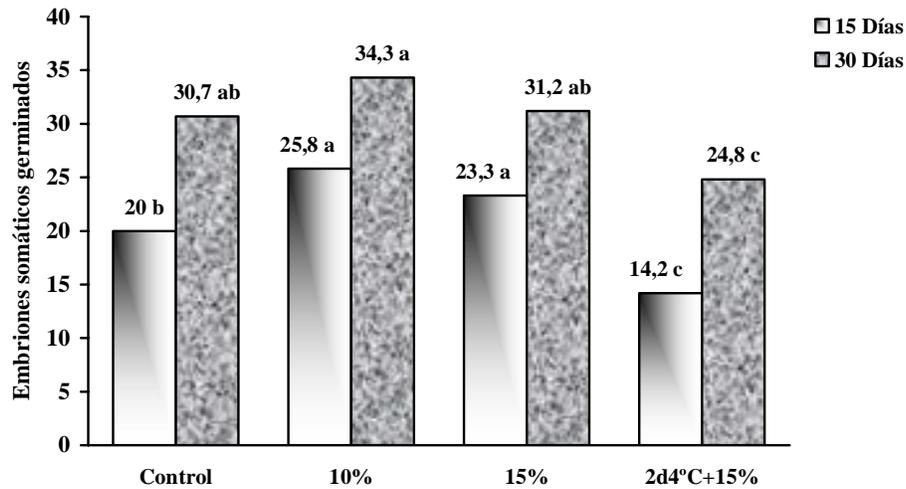
#### **4.4. Evaluación de la germinación de los embriones somáticos obtenidos a partir de suspensiones celulares criopreservadas.**

A los 15 días de colocado los embriones somáticos en el medio de cultivo, se comenzó a observar una pequeña protuberancia de color verde conocida como plúmula clorofílica con el subsiguiente desarrollo de la raíz y a los 30 días se observó una germinación completa de estos embriones.

En el proceso de germinación de los embriones somáticos se conoce que intervienen diferentes factores. Entre ellos se encuentra el estado de maduración del embrión,

asociado a la acumulación de reservas y las condiciones de cultivo en la cámara de crecimiento (temperatura e iluminación).

Como se puede apreciar en la figura 3, a los 15 días la mayor cantidad de embriones germinados correspondió a las SCE criopreservadas, crioprotectadas con 10 % y 15% de DMSO. Estos tratamientos presentaron diferencias significativas con el control no criopreservado.



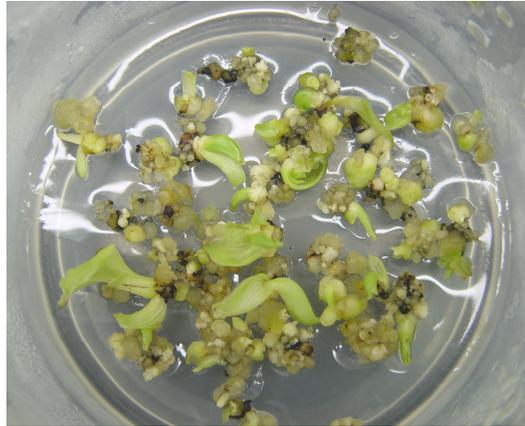
\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $P < 0.05$  según Duncan

**Figura 3.** Comportamiento del número de embriones somáticos germinados a partir de SCE criopreservadas, a los 15 y 30 días de cultivo, comparados con el control no criopreservado.

El incremento en el número de embriones germinados a partir de SCE criopreservadas puede deberse a la acumulación de sustancias de reserva que ocurre durante el proceso de congelación y una vez que se restablecen las condiciones de crecimiento estos tejidos se desarrollan y crecen con mayor rapidez que los no criopreservados.

A los 30 días se observa un desarrollo uniforme de la germinación de los embriones somáticos (Figura 3) y los mejores tratamientos correspondieron a las SCE criopreservadas, crioprotectadas con 10% y 15% de DMSO, sin diferencias significativas con el control no criopreservado.

La figura 4 muestra la germinación de los embriones somáticos formados a partir de SCE criopreservadas.



**Figura 4:** Embriones somáticos germinados del cultivar CEMSA ¾ a los 30 días de cultivo

En la literatura consultada encontramos que Panis *et al.*, 2000 lograron en medio de cultivo semisólido la formación de embriones que provenían de SCE criopreservadas y estos fueron utilizados para el establecimiento de nuevas suspensiones.

Ochatt (2005) logró mejorar la sincronización en la germinación de los embriones somáticos obtenidos de SCE criopreservadas de arroz al precultivarlo 48 horas a 4°C (comunicación personal).

#### **4.5. Evaluación de las plantas obtenidas a partir de suspensiones celulares criopreservadas en casa de cultivo.**

La habilidad de obtener plantas *in vitro* con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Fuji *et al.*, 1990). A los 50 días de plantadas en la fase de aclimatización, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre las dos poblaciones de plantas estudiadas.

Las plantas obtenidas de SCE no criopreservadas y criopreservadas tuvieron una supervivencia en esta fase de 97.8 y 98.2% respectivamente, sin diferencias estadísticas

entre ellas. Las plantas de ambas procedencias en este estudio tenían características fenotípicas normales de acuerdo a las características de la variedad.

Durante el desarrollo de las plantas en la casa de cultivo hasta los 50 días (Figura 3), no se observaron cambios morfológicos, tales como la coloración de las hojas y el pseudotallo, ni plantas fuera de tipo, *Grele* (Sandoval *et al.*, 1997). Esto no quiere decir que no hubo variaciones en estas poblaciones sino que en esta fase no fue posible detectarlas, además estos mismos autores señalan que solamente se puede detectar alrededor de un 60% de variantes somaclonales en dicha fase de crecimiento y que es necesario las evaluaciones de estas plantas en campo hasta completar el ciclo de desarrollo por varias generaciones.



**Figura 5:** Comportamiento en casa de cultivo de plantas del cultivar ‘CEMSA ¾’ obtenidas a partir de SCE crioconservadas.

Según estudios realizados, hasta el presente no se atribuyen modificaciones inducidas por la conservación en nitrógeno líquido de suspensiones de células de caña de azúcar (Chowdury y Vasil, 1993), ni tampoco en meristemos de fresa (Karthan *et al.*, 1980)

Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Engelmann (1991b), quien encontró que árboles de palma de aceite formados de embriones somáticos crioconservados mostraron un desarrollo vegetativo y floral comparables con las plantas controles. Plantas regeneradas de embriones somáticos de naranja dulce que presentaron supervivencia después del nitrógeno líquido no mostraron anomalías fenotípicas

(Marín *et al.*, 1993), y no se observaron cambios en cultivos de embriones somáticos de pino después de los tratamientos crioprotectores y la crioconservación (Aronen *et al.*, 1999).

Park *et al.* (1998) encontró un alto grado de estabilidad en los caracteres morfológicos de plantas regeneradas obtenidas de clones embriogénicos de pino blanco después de tres y cuatro años almacenados en nitrógeno líquido.

Martínez *et al.*, (2002), evaluaron el comportamiento en campo de las plantas obtenidas a partir de callos embriogénicos de caña de azúcar que fueron crioconservados y no observaron cambios fenotípicos en la población estudiada al compararla con las plantas provenientes de callos embriogénicos no crioconservados en los caracteres morfológicos.

Côte *et al.* (2002), no encontraron diferencias en los caracteres morfológicos de plantas que fueron llevadas y estudiadas en campo provenientes de embriones somáticos crioconservados de banano.

No obstante a pesar de los reportes mencionados anteriormente esto no excluye la posibilidad de variación somaclonal en estas poblaciones, sino que en esta fase no fue posible detectarla. Sandoval *et al.* (1997) señalan que se hace necesario las evaluaciones de estas plantas en campo hasta completar el ciclo de desarrollo por dos generaciones.

Los diferentes estudios realizados y los correspondientes resultados obtenidos en esta investigación permiten proponer un esquema (Figura 6) para la crioconservación de SCE obtenidas a partir de callos con estructuras embriogénicas, provenientes de domos meristemáticos de yemas axilares en el cultivar 'CEMSA ¾'. Este sistema puede ser usado como una herramienta para la transformación genética de este cultivar de plátano, así como una vía de propagación masiva y conservación de germoplasma.

## 5. Conclusiones

1. Se comprobó que el precultivo con  $180 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarosa afecta la vitalidad de las suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas de CEMSA  $\frac{3}{4}$ .
2. Se logró la recuperación de los agregados celulares embriogénicas crioconservados en medio de cultivo de formación de embriones cuando se realizó el precultivo a  $4^{\circ}\text{C}$ . sin diferencias estadísticas con el control
3. Se alcanzó el mayor número de embriones germinados originados de suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas con 10% y 15% de DMSO.

## **6. Recomendaciones**

- ✓ Desarrollar nuevas estrategias para la recuperación de las suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas en la variedad CEMSA ¾.
- ✓ Realizar estudios para determinar las causas que provocan la baja regeneración de las suspensiones celulares embriogénicas criopreservadas

## 7. Referencias Bibliográficas

- Acosta I. (2006): Conservación *in vitro* del híbrido IBP 42-99 de papaya (*Carica papaya* L.). Tesis para aspirar por el grado científico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. UCLV. IBP. Santa Clara. 50p.
- Adams LK, Benson EE, Staines HJ, Bremmer DH, Millam S, Deighton N (1999) Effects of the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of *in vitro* plants cells. *J. Plant Physiol.*, 155: 376-386.
- Agramonte D., Pérez J., Pérez M., Pérez A. 1993. Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCl) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. *Centro Agrícola* 2, 88-89.
- Ait Barka E, Kalantari S, Makhlof J, Arul J (2000) Effects of UV-C irradiation on lipid peroxidation markers during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits. *Aust. J. Plant Physiol.*, 27: 147-152.
- Al-Forkan M, Anthony P, Power JB, Davey MR, Lowe KC (2001) Effect of *Erythrogen*<sup>TM</sup> on post-thaw recovery of cryopreserved cell suspensions of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Cryo-Letters*, 22: 367-374.
- Amarasinghe V., Dhama R., Carlson J.E. 1996. Polyamine biosynthesis during somatic embryogenesis in interior spruce (*Picea glauca* x *Picea engelmannii* complex). *Plant Cell Reports* 15, 495-499. and conversion to plants. *Plant Sci.* 72, 93-97.
- Ammirato P.V. 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: suspensions culture techniques and hormone requirements. *Bio/Technology* 1, 68-73.
- Anchordoguy, T.J., A.S. Rudolph, J.F. carpenter and J. H. Crowe. 1991. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Criobiology* 24: 324-331.
- Aronen TS, Krajnakova J, Haggman HM, Ryyanen LA (1999) Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Sci.* 142:163-172; 1999.

- Ashmore SE (1997) Status reports on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia, p. 67.
- Bailey E, Deighton N, Clulow SA, Goodman BA, Benson EE (1994) Changes on free radical profiles during the callogenesis of responsive and recalcitrant potato genotypes. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 102B: 243-246.
- Bajaj YPS (1983) Cassava plants from meristem cultures freeze-preserved for three years. *Field Crop Research*, 7: 161-167.
- Baker C.M., Durham R.E., Burns J.A., Parrott W.A., Wetzstein H.Y. 1995. High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed. *Plant Cell Reports* 15, 38-42.
- Barranco L.A. 2000. Desarrollo de la embriogénesis somática en medios líquidos (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano'). Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 30-47.
- Barranco L.A. 2001. Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. FHIA-18) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis para aspirar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara. Pp 97.
- Belous AM, Gordienko EA, Rozanov LF (1987) Congelación y crioprotección (en ruso). *Bioquímica de las membranas*. Moscú, Editorial Escuela Superior, p 80.
- Benson EE (2000) Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36: 163-170.
- Benson EE y Noronha-Dutra (1988) Chemiluminescence in cryopreserved plant tissue cultures. The possible role of singlet oxygen in cryoinjury. *Cryo-Letters*, 9: 120-131.
- Benson EE y Withers LA (1987) Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures. Anon-destructive method for assessing stability. *Cryo-Letters*, 8: 35.
- Benson EE, Lynch PT, Stacey GN (1998) Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. *Ag Biotech News and Information*, 10(5): 133-142.

- Benson EE, Roubelakis-Angelakis KA (1994) Oxidative stress in recalcitrant tissue cultures of grapevine. *Free Radicals in Biology and Medicine* 16: 355-362.
- Bermúdez I. 2000. Selección de somaclones mejorados en el híbrido de plátano FHIA-21 (AAAB) con el uso combinado de la mutagénesis *in vitro* y el cultivo de tejidos. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 34-52.
- Bhaskaran S., Smith R.H. 1992. Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. *Plant Cell Reports* 12, 22-25.
- Bieberach C. 1995. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* spp. Tesis para optar al grado de *Magíster Scientiae*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p. 86.
- Blakesley D y Kiernan RJ (2001) Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid. *Cryo-Letters*, 22: 13-18.
- Broto F, Clausse D (1976) A study of the freezing of supercooled water dispersed within emulsions by differential scanning calorimetry, *J. Phys.* 9: 42-51.
- Brown D.C.W., Finstad K.I., Watson E.M. 1995. Somatic embryogenesis in Herbaceous Dicots. En: Thorpe T.A. (Ed) *In vitro* embryogenesis in plant. London: Kluwer Academic Publishers pp. 345-415.
- Cabrera M. 2001. Embriogénesis somática en *Musa* (AAB) cv. Navolean empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 29-45.
- Cassells AC y Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 145-157.
- Charoensub R, Phansiri S, Sakai A, Yongmenitchai W (1999) Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot tips cooled to -196°C by vitrification. *Cryo-Letters*, 20: 89-94.
- Chen THH y Kartha KK (1986) Cryopreservation of plant cells and organs. En: FA Valentine (ed.). *Forest and Crop Biotechnology: Progress and prospects*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp 217-240.

- Chong P B, Bermúdez CI, López J., Machado J., Portal O., Alvarado Y., Swennen R., Sagi L., Gómez KR. 2004: genetic transformation using chimeric antifungal genes. 1<sup>st</sup>. International Congress on Musa. Penang, Malasia. Abstract.
- Choudhary M.L., Chin C.K. 1995. Somatic embryogenesis in cell suspension culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Growth Regulation* 16, 1-4.
- Clarke CJ, Buckley SL, Lindner N (2002) Ice structuring proteins-a new name for antifreeze proteins. *Cryo-Letters* 23: 15-21.
- Côte F, Folliot M, Domergue R & Dubois C (2000) Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grand Naine). *Euphytica* 112:245-251
- Côte F., Domergue R., Monmarson S., Schwendiman J., Teisson C., Escalant J. V. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. 'Grand Naine'. *Physiologia Plantarum* 97, 285-290.
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 73-103.
- Cyr D (1998) Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. En: SM Jain, PK Gupta, RJ Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Vol. 4, Kluwer Academics, pp. 1-15.
- Danso KE y Ford-Lloyd BV (2003) Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. *Plant Cell Rep* 21:718-725.
- Dennis J., Trigiano N., Conger V. 1993. Liquid suspension culture production of Orchard grass somatic embryos and their potential for the breeding of improved varieties. En: Redenbaugh K. (Ed) *Synseeds applications of synthetic seeds to crop improvement*, pp. 351-365. Calgene Inc. Daris, California.
- Dereuddre J y Engelmann F (1987) The use of cryoprotection for setting up banks of plant germplasm. En: Porc. Coll. Franco-Britannique IAPTC, Angers, France. 48-78.
- Dhed'a D. 1992. Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et regeneration en plantules par embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.), Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 171.

- Dhed'a D., Dumortier F., Panis B., Vuylsteke D., De Langhe E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* sp. ABB group). *Fruits* 46, 125-135.
- Du Z y Bramlage WJ (1995) Peroxidative activity of apple peel in relation to development of post storage disorders. *HortScience*, 30: 205-208.
- Dudits D., Györgyey J., Bögre L., Bako L. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. En: Thorpe T.A. (Ed) *In vitro* embryogenesis in plants. London: Kluwer Academic Publishers pp. 267-308.
- Dumet D y Benson EE (2000) The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. En: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. F Engelmann, H Takagi (eds.). JIRCAS, Tsukuba, Japan/IPGRI, Rome, Italy, pp. 43-56.
- Dussert S, Chabrillange N, Engelmann F, Anthony F, Hamon S (1998) Cryopreservation of seeds of four coffee species: importance of water content and cooling rate. *Seed Science Research*, 8: 9-15.
- Engelmann F (1991b) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Eufhytica* 57: 227-243.
- Engelmann F (1997) *In vitro* conservation methods. En: JA Callow, BV Ford-Lloyd, HJ Newbury (eds.) *Biotechnology and Plant Genetic Resources*, CAB International, pp 119-161.
- Engelmann F (2000) Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: F Engelmann, H Takagi (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma, Italia. Pp. 8-20.
- Engelmann F, Dambier D, Ollitrault P (1994) Cryopreservation of cell suspensions and embryogenic calluses of citrus using a simplified freezing process. *Cryo-Letters*, 15: 53-58.

- Engelmann F, Takagi H (2000) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma, Italia. Pp. 8-20.
- Engelmann F. & Y. Duval. 1986. Cryopreservation of oil palm somatic embryos ( *Elaeis guineensis* Jacq. ) : results and application prospects. *Oléagineux* 41: 169-174
- Escalant J.V., Teisson C., Cote F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro* Plant Cell. and Dev Biol. 30, 181- 186.
- Esterbauer H, Zollner H, Schauer RJ (1988) Hydroxyalkenals: Citotoxics products of lipid peroxidtion. En: ISI Atlas of Sciences: Biochemistry, 311-317.
- Fahy GM (1986) The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 23: 1-13.
- FAO (2004). Boletín trimestral. FAO de estadísticas.
- Feirer R.P., Simon P.W. 1991. Biochemical differences between carrot inbreds differing in plant regeneration potential. *Plant Cell Reports* 10, 152-155.
- Finkle BJ, Zavala ME, Ulrich JM (1985) Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. En: KK Kartha (ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press. Boca Raton. FL. pp. 61-75.
- Franks F (2003) Scientific and technological aspects of aqueous glasses. *Biophysical Chemistry*, 105: 251-261.
- Fuji J., Slade D., Olsen R., Ruzin S., Redenbaugh K. 1990. Alfalfa somatic embryo maturation
- Fukai S, Goi M, Tanaka M (1994) The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation. *Scientia Horticulturae*, 57: 347-351.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263-285.

- Gnanapragasam S y Vasil IK (1992) Cryopreservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science*, 83: 205-215.
- Gómez R, Gilliard T, Barranco LA & Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB). *Infomusa* 9(1):12-16
- Gómez R.K. 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez J.N. (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, pp. 57-79.
- Gómez R.K., De Fera M., Posada L.P., Gilliard T., Bernal F.M., Reyes M.V., Chávez M.M., Quiala E.M. 2002. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, 21-26.
- González Benito, M.E., J.M. Iriondo, J.M. Pita and F. Pérez García 1995. Effect of seed cryopreservation and priming on germination in several cultivars of *Apium graveolens*. *Annals of Botany* 75:1-4.
- González L. 2005. Caracterización de la variabilidad genética en genotipos tipo vianda de *Musa* spp. Tesis presentada en opción al título académico de Magister Scientiae en Agricultura Sostenible. UCLV, Santa Clara, Cuba. 96 p.
- González-Arno MT, Ravelo MM, Urra C, Martínez-Montero ME, Engelmann F (1998) Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. *Cryo-Letters*, 19: 375-382.
- Grapin A., Ortiz J.L., Domergue R., Babeau J., Monmarson S., Escalant J.V., Teisson C., Cote F. 1998. Obtención de callos embriogénicos, iniciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas a partir de flores inmaduras masculinas y femeninas de *Musa*. *INFOMUSA* 7(1), 13-15.
- Grapin A., Schwendiman J., Teisson C. 1996a. Somatic embryogenesis in plantain banana. *In vitro Plant Cell. and Dev. Biol.* 32, 66-71.
- Grout BWW (1995) Introduction to the *in vitro* preservation of plants cells, tissues and organs. En: BWW Grout (ed.). *Genetic preservation of plants cells in vitro*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1-20.

- Guy C (1999) Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* , 1(2):231-242.
- Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plants cells: A Review. *Cryo-Letters*, 25: 3-22.
- Harding K y Staines H (2001) Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot-tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation. *Cryo-Letters*, 22: 255-262.
- Harding, K. 1991. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plant recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55: 141-146.
- Helliot B, Madur D, Dirlwanger E, De Boucaud MT (2002) Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Prunus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38: 493-500.
- Hendry GAF (1993) Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Res.*, 3: 141-153.
- Hepher A., Boulter M.E., Harris N., Nelson R.S. 1988. Development of a Superficial Meristem During Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean (*Glycine max* L.). *Annals of Botany* 62, 513-519.
- Hincha DK y Schmitt JM (1992) Freeze-thaw injury and cryopreservation of thylakoid membranes. En: GN Somero, CB Osmond, CL Bolis (eds.). *Water and Life, Comparative Analysis of Water Relationship at the Organismic Cellular and Molecular Level*. Springer-Verlag, pp. 316-337.
- Ho W.J., Vasil I.K. 1983. Somatic embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension Cultures. *Annals of Botany* 51, 719-726.
- INIBAP 1998. Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 1997. International network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France.
- Ivanova A., Velcheva M., Denchev P., Atanassov A., Van Onckelen H.A. 1994. Endogenous hormone levels during direct embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiologia Plantarum* 92, 85-89.

- Jansen M.A.K., Booij H., Schel J.H.N., De Vries S.C. 1990. Calcium increase the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 9, 221-223.
- Jeannin G., Bronner R., Hahne G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar, *Plant Cell Reports* 15, 200-204.
- Kartha KK (1985) Meristem culture and germplasm preservation. En: KK Kartha (ed.). Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Boca Raton, pp. 115-134.
- Kartha KK, Fowke LC, Leung NL, Caswell KL, Hakman I (1988) Induction of embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol.*, 132: 529-539.
- Keller E.R.J., Marion Grube and Angelika senula, 2005: Crioconservación en el Banco de germoplasma de Gatersleben. Estado del arte en papa, ajo y menta. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal. Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible. Resúmenes. Pp15.
- Kinoshita K, Li SJ, Yamazaki M (2001) The mechanism of the stabilization of the hexagonal II (H<sub>II</sub>) phase in PE membranes in the presence of low concentrations of dimethyl sulphoxide. *Eur. Biophys. J.*, 30: 207-220.
- Kiyosue T., Satoh S., Kamada H., Harada H. 1991. Purification and Immunohistochemical Detection of an Embryogenic Cell Protein in Carrot. *Plant Physiology* 95, 1077-1083.
- Kohmura H, Sakai A, Chokyl S, Yakuwa T (1992) Cryopreservation of *in vitro*-cultured multiple bud clusters of asparagus (*Asparagus officinalis* L. cv. Hiroshima green (2n=30) by the technique of vitrification. *Plant. Cell Rep.* 11: 433-437.
- Krishnaraj S., Vasil I.K. 1995. Somatic embryogenesis in Herbaceous Monocots En: Thorpe T.A. (ed). *In vitro* embryogenesis in plant. London: Kluwer Academic Publishers pp. 417-470.
- Langis R y Steponkus P. L (1991) Vitrification of isolated rye protoplasts: Protection against dehydration injury by ethylene glycol. *Cryo-Letters.* 12: 107-112.

- Langis R, Schnabel B, Earle ED, Steponkus PL (1989) Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *Cryo-Letters*, 10: 421-428.
- Lazzeri P.A., Hildebrand D.F., Collins G.B. 1987. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Molecular Biology Reporter* 10, 209-215.
- Levine M. 1950. The growth of normal plant tissues *in vitro* as affected by chemical carcinogens and plant growth substances. The culture of the carrot tap root meristem. *American Journal of Botany* 37, 445-458.
- Liu C.M., Xu Z.H., Chua N.H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5, 621-630.
- López Z.M. 1989. El plátano. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.
- Ma S.S. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops. Taipei, Taiwan. National Taiwan University, June pp. 181-188.
- Maddox AD, Gonsalves F, Shields R (1983) Successful preservation of suspension cultures of three *Nicotiana* species at the temperature of liquid nitrogen. *Plant Science Letters*, 28: 157-162.
- Marín ML, Gogorcena Y, Ortiz J, Duran-Vila N (1993) Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing thawing treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 27-33.
- Marroquín C.G., Paduscheck C., Escalant J.V., Teisson C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro Plant Cell. and Dev Biol.* 29, 43-46.
- Martínez-Montero M.E., N. Mora, J. Quiñones, M.T. González-Arno, F. Engelman and J. C. Lorenzo, 2002: Effect criopreservation on the structural and funcional integrity of cell membranas of sugarcane (*Saccharum* sp.) Embryogenic calluses. *Cryoletters* 23, 237-244. *Cryoletters*/o Royal Veterinary College, London NW1 OTU, UK.
- Martínez-Montero ME, Martínez J, Engelmann F y González-Arno MT (2004) Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) apices y calluses. *Acta*

- Horticulturae (ISHS) 666: IV International Pineapple Symposium. [en línea] 2005. Disponible en:<http://www.actahort.org/> [Consulta 10 de Octubre del 2005].
- Mazur P (1970) Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, 168: 939-949.
- Mazur P (1984) Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247: 125-142.
- McCain J.W., Kamo K.K., Hodges T.K. 1988. Characterization of somatic embryo development and plant regeneration from friable maize callus cultures. *The Botanical Gazette* 149, 16-20.
- McGann LE y Walterson ML (1987) Cryoprotection by dimethyl sulphoxide and dimethyl sulfone. *Cryobiology*, 24: 11-16.
- Meir S, Philosoph-Hadas S, Aharoni N (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during parsley by a newly developed method. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 117: 128-132.
- Merkle S.A., Parrott W.A., Flinn B.S. 1995. Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe T.A. (ed). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. London pp. 155-203.
- Murashige T., Skoog T. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.
- Navarro C., Escobedo R., Mayo A. 1997. *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51, 17- 25.
- Nayak P., Sen S.K. 1989. Plant Regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of a minor millet, *Paspalum scrobiculatum*. *Plant Cell Reports* 8, 296-299.
- Niino T., Seguel I., and Murayama T., 2000. Cryopreservation of vegetatively propagated species (mainly mulberry). Cryopreservation of tropical germoplasm. Current research progress and application. Session 2. Cryopreservation techniques. P. 194-199.

- Novak F.J., Afza R., Van Duren M., Perea-Dallos M., Conger B. V., Xiaolang T. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of desert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.) BioTechnol. 7, 147-158.
- Ochatt S., 2005: Plant cryopreservation. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal. Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible. Resúmenes. Pp15.
- Panis B (1995) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. Dissertationes de Agricultura 272. Catholic University of Leuven, Bélgica, p. 201.
- Panis B y Thinh NT (2001) Crioconservación de germoplasma de *Musa*. Guías técnicas INIBAP 5 (J.V. Escalant y S. Sharrok, eds). Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia, p.17-20.
- Panis B, Totte N, Van Nimmen K, Withers LA, Swennen R (1996) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. Plant Science, 121: 95-106.
- Panis B., Hannelore Strosse, Regis Domergue, Jean- Vicente Escalant y Francois Côte. 2003 : Suspenciones de células embriogénicas de babanos y plátanos. INIBAP ISBN: 2-910810-65-8. Internacional Plant genetic Resources Institute
- Panis B., Shoofs H., Remy S. Sagi R. And Swennen R.; 2000: Cryopreservation of banana embryogenic cell suspensions: an aid for genetic transformation. Cryopreservation of tropical germoplasm. Current research progress and application. Session 2. Cryopreservation techniques. P. 103-109.
- Park YS, Barret JD, Bonga JM (1998) Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry. In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant, 34: 231-239.
- Paulet F, Engelmann F, Glaszmann JC (1993) Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrids) using encapsulation/dehydration. Plant Cell Rep., 12: 525-529.
- Pennycooke JC y Towill LE (2000) Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato by vitrification. Plant Cell Rep., 19: 733-737.
- Pérez JN & Orellana P (1994) *Musa* Improvement in Cuba. En: Jones DR (Ed) The Improvement and testing of *Musa*: A Global Partnership, pp. 203-206. Honduras.

- Pérez JN, Agramonte D, Jiménez F, Ramírez D (1999) Informe Final del Proyecto “Desarrollo y perfeccionamiento de la propagación masiva en las fases III y IV, enraizamiento y adaptación en caña de azúcar, papa, plátanos y bananos y adaptación de semillas artificiales en caña de azúcar” IBP, Santa Clara.
- Quinn, P. J. 1985 A lipid-phase separation model of low- temperature damage to biological membranes. *Cryobiology* 22: 128-146.
- Reed BM, Dumet D, Denoma JM, Benson EE (2001) Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. *Biodiversity and Conservation*, 10: 939-949.
- Reinhoud PJ, Van Iren F, Kijne JW (2000) Cryopreservation of undifferentiated plant cells. En: F Engelmann, H Takagi (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma, Italia; pp. 91-102.
- Robertson L, Magill WJ, Benson EE, Bremmer DH, Buultjens TEJ (1995) Oxidative in the plant tissue culture environment. *Biochem. Soc. Transactions*, 23:525-529.
- Rodríguez S. 2000. Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca, plátanos y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos de la producción (FAP) y su manejo integrado. Informe final, Programa Nacional Científico.
- Sági L., Remy S., Swennen R. 1998. Genetic transformation for the improvement of bananas – a critical assessment. *INIBAP Annual Report 1997*. pp. 33-36.
- Sakai A (2000) Development of cryopreservation techniques. En: F Engelmann, H Takagi (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma, Italia; pp. 1-7.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 9: 30-33.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1991b) Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. *J. Plant Physiol.* 137: 465-470.
- Sakai, A. 1960. Survival of the twig of woody plants at -196°C *Nature* 185: 293-394.

- Sakai, A. 1995- Criopreservación de germoplasma de plantas leñosas Pp. 53-69 in Biotechnology in Agriculture Forestry Vol. 32: Cryopreservation of plants Germoplasma. 1 (Y.P.S. Bajai. Ed.). Springer- Verlag, Heidelberg.
- Sandoval JA, Pérez L & Côte F (1997) Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano). CORBANA 22(48):41-60
- Santos A., López J., Cabrera M., Montano M., Reinaldo D., Ventura JC., Medero V., García M., Basail M., Rayas A., 2002: Obtención de embriones somáticos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el clon de plátano "Navolean" (AAB). Biotecnología Vegetal. 2 (2) 107-109.
- Sasson A. 2001. Cultivos transgénicos: hechos y desafíos. Editorial Scientiae, La Habana, Cuba. Pp. 373.
- Satoh S., Kamada H., Harada H., Fuji T. 1986. Auxin-controlled Glycoprotein Release into the Medium of Embryogenic Carrot Cells. Plant Physiology 81, 931-933.
- Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 257.
- Schrijmakers EWM y Van Iren F (1995) A two-step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. En: Day JG, MR McLellan (eds.). Methods in Molecular Biology, Vol.38: Cryopreservation and freezing-drying protocols. Humana Press Inc. pp. 103-111.
- Scotti P, Quartín V Cochicho J, Nunes MA (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. J. Plant Physiol. 160: 283-292.
- Shewfelt RL y Purvis AC (1995) Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. HortScience 30: 213-218.
- SIGMA (1991) Catalogue Sigma Chemical Company. USA.
- Simmonds N.W. 1962. The evolution of the Bananas. London, UK: Longman p. 163.
- Simmonds N.W. 1966. Bananas. London, UK: Longman.
- Steponkus PL y Webb MS (1992) Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. En: Somero GN, Osmond CB, Bolis CL (eds.). Water and

- Life, Comparative analysis of Water Relationship at the Organismic Cellular and Molecular Level. Springer-Verlag, pp. 338-362.
- Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., van Kammen A., De Vries S.C. 1991. Cell-specific Expression of the Carrot EP2 Lipid Transfer Protein Gene. *The Plant Cell* 3, 907-921.
- Steward F.C., Mapes M.O., Smith J. 1958. Growth and organized development of cultured cells. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45, 693-704.
- Stuart D.A., Strickland S.G. 1984. Embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa*. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Sci. Lett* 34, 74-81
- Sun W, Montagu MV, Verbruggen N (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochem et Biophys Acta* 1577: 1-9.
- Sun WQ (1999) State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds. *Cryobiology* 38: 372-385.
- Sung Z.R., Okimoto R. 1981. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 6, 3683-3687.
- Svensson J, Ismail AM, Palva ET, Close TJ (2002) Dehydrins. En: KB Storey y JM Storey (eds.). *Sensing Signaling and Cell Adaptation*. Elsevier Science, pp. 155-171.
- Tetteroo FAA (1996) Desiccation tolerance of somatic embryoids. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Thierry C, Florin B, Petiard V (1999) Changes in protein metabolism during the acquisition of tolerance to cryopreservation of carrot somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 145-154.
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.
- Thompson A.K. 1995. Banana Processing. En: Gowen S. (ed). *Bananas and Plantains*. Chapman and Hall, UK pp. 481-492.
- Tisserat B, Esan EB & Murashige T (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1:1-78

- Toonen M.A.J., Hendriks T., Schmidt E.D.L., Verhoeven H.A., Van Kammen A., De Vries S.C. 1994. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194, 565-572.
- Towill LE (1990) Cryopreservation of isolated mint shoots tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9: 178-180.
- Towill LE (1996) In: *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. R. Trigiano and D. J. Gray (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp 291-296.
- Turner SR, Senaratna T, Bunn E, Tan B, Dixon KW, Touchell DH (2001) Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Annals of Botany*, 87: 371-378.
- Uragami A, Sakai A, Nagai M, Takahashi T (1989) Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep.* 8: 418-421.
- Usami S, Ohta S, Korami T, Burnell JN (1995) Cold stability of pyruvate, orthophosphate di-kinase of *Flaveria brownii*. *Plant Molecular Biology*, 27: 969-980.
- Vasil K. 1985. Somatic embryogenesis and its consequences in the *Gramineae*. En: Henke R.R., Hughes K.W. and Constantin M.J. (eds). *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. New York, Plenum Press. p. 31.
- Vasil K. 1987. Developing Cell and Tissue Culture Systems for the Improvement of Cereal and Grass Crops. *Journal of Plant Physiology* 128, 193-218.
- Vasil V., Vasil K. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet, *Gramineae*). *American Journal of Botany* 69, 1441-1449.
- Vuylsteke D. 2001. Strategies for utilization of genetic variation in plantain improvement. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium. 213 p
- Watanabe K, Kuriyama A, Kawai F, Kanamori M (1999) Effect of cryoprotectant treatment and post-thaw washing on the survival of cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells after cryopreservation. *Cryo-Letters* 20: 377-382.

- Widholm J. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of culture plant cells. *Stain Technology* 47, 189-194.
- Wiggans S.C. 1954. Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany* 41, 321-326.
- Williams E.G., Maheswaran G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57, 443-462.
- Wilson PW, Heneghan AF, Haymet ADJ (2003) Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. *Cryobiology*. 46: 88-98.
- Withers LA (1980) Low temperature storage of plant tissue cultures. En: A Fiechter (ed.). *Advances in biochemical engineering, Plant Cell Cultures II*, Vol. 18. Springer-Verlag, Basel, pp. 101-149.
- Withers LA (1985) Cryopreservation of cultures plant cells and protoplasts. En: KK Kartha (ed.). *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Boca Raton. pp: 243-267.
- Withers, L.A. and F Engewlmann. 1997: In vitro conservation of plant genetic resources. Pp 57-88 in *Biotechnology in Agriculture*, A. Altman ed., Marcel Dekker Inc, New York.
- Wu Y, Zhao Y, Engelmann F, Zhou M, Zhang D, Chen S (2001) Cryopreservation of apple dormant buds and shoots tips. *Cryo Letters*. 22(6):375-80. [en línea] 2001. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Consulta 14 de Diciembre del 2005].
- Zachariassen KE y Kristiansen E (2000) Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*. 41: 257-279.
- Zhao C, Wu Y, Engelmann F, Zhou M. (2001) Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. *Cryo-Letters*. 22(5): 321-328.
- Zhuang H, Hildebrand DF, Barth MM (1995) Senescence of broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 43:2585-2591.