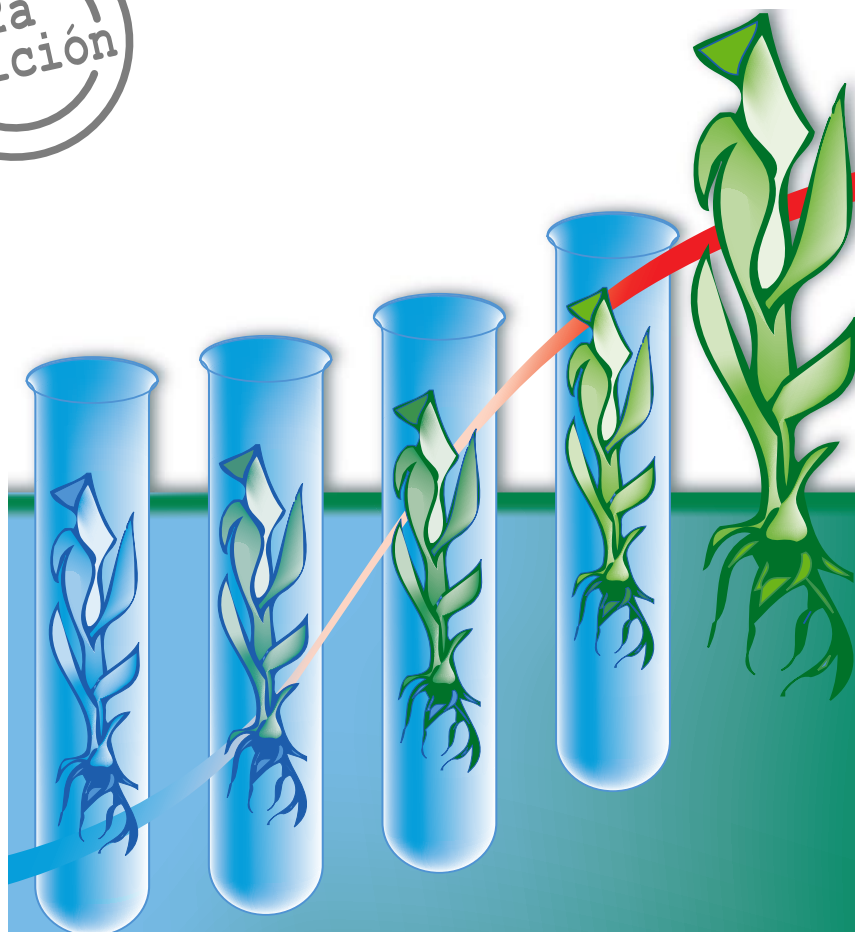




Crioconservación de germoplasma de *Musa*

Bart Panis



Bioversity International es un organismo internacional autónomo, de carácter científico, que busca contribuir al bienestar actual y futuro de la humanidad mejorando la conservación y el aprovechamiento de la agrobiodiversidad en fincas y bosques. Es uno de los 15 Centros auspiciados por el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAI), una asociación de miembros del sector público y privado, que apoyan la ciencia para reducir el hambre y la pobreza, mejorar la nutrición y la salud de la población, y proteger el ambiente. Bioversity tiene su sede principal en Maccaresse, cerca a Roma, Italia, y oficinas en más de 20 países. Bioversity opera mediante cuatro programas: Diversidad al Servicio de las Comunidades, Comprensión y Manejo de la Biodiversidad, Asociaciones Colaborativas de Carácter Mundial, y Cultivos de Subsistencia para una Vida Mejor.

El carácter de organismo internacional de Bioversity lo confiere la firma del Convenio de Creación de la organización, el cual, a enero de 2008, había sido ratificado por los gobiernos de los siguientes países: Argelia, Australia, Bélgica, Benin, Bolivia, Brasil, Burkina Faso, Camerún, Chile, China, Congo, Costa Rica, Costa de Marfil, Chipre, Dinamarca, Ecuador, Egipto, Eslovaquia, Etiopía, Ghana, Grecia, Guinea, Hungría, India, Indonesia, Irán, Israel, Italia, Jordania, Kenia, Malasia, Mali, Mauritania, Marruecos, Noruega, Omán, Pakistán, Panamá, Perú, Polonia, Portugal, la República Checa, la República de Mauricio, Rumania, Rusia, Senegal, Sudán, Suiza, Siria, Túnez, Turquía, Ucrania y Uganda.

Los programas de investigación de Bioversity reciben apoyo financiero de más de 150 donantes, incluyendo gobiernos, fundaciones privadas y organismos internacionales. Información adicional sobre los donantes y las actividades de investigación de Bioversity aparece en los Informes Anuales de la organización, disponibles en forma electrónica en la dirección www.bioversityinternational.org, o en forma impresa en la dirección bioversity-publications@cgiar.org.

Las designaciones geográficas empleadas en esta publicación al igual que la presentación del material no expresan en modo alguno opinión de Bioversity o del GCIAI sobre el estatus legal de ningún país, territorio, ciudad o región, ni acerca de sus autoridades o de la delimitación de sus fronteras. Así mismo, las opiniones expresadas son las de los autores y no necesariamente reflejan los puntos de vista de estas organizaciones.

La mención de alguna marca registrada se suministra con fines informativos únicamente, no de apoyo al producto.

Cita: Panis B. 2009. Crioconservación de germoplasma de *Musa*. 2a edición. Guías técnicas No. 9 (F. Engelmann y E. Benson, eds). Bioversity International, Montpellier, Francia.

INIBAP ISBN 978-2-910810-88-7

© Bioversity International, 2009

Bioversity International
Via dei Tre Denari, 472/a
00057 Maccaresse
Rome, Italia

Bioversity - France
Parc Scientifique Agropolis
34397 Montpellier Cedex 5
Francia



Crioconservación de germoplasma de *Musa*

2a edición

Bart Panis

Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven,
Leuven, Bélgica

Florent Engelmann¹ y Erica Benson², editores

¹ IRD, UMR DIAPC, BP 64501 34394 Montpellier cedex 5, Francia y Bioversity
International, Via dei Tre Denari 472/a, 00057 Maccarese (Fiumicino),
Roma, Italia

² Damar Research Scientists, Damar, Drum Road Cupar Muir, Fife,
Ky15 5RJ, Escocia.

Agradecimientos

El autor agradece:

- El *Directorate General for Development Cooperation* (DGDC), Bélgica por su apoyo financiero a través de Inibap (Red internacional para el mejoramiento del banano y el plátano, ahora Bioversity International), así como el Banco Mundial en el marco del proyecto *Global Crop Diversity Trust* y de la *Collective Action for the Rehabilitation of Global Public Goods in the CGIAR Genetic Resources System*, y la Fundación Gatsby, por sus aportes financieros a las investigaciones sobre los protocolos presentados en estas guías.
- Bioversity International por el aporte de los recursos necesarios para hacer realidad la publicación de estas guías técnicas.

Desea además manifestar agradecimientos especiales a:

- Erica Benson y Florent Engelmann, especialistas en crioconservación, por su valioso labor como editores científicos,
 - Claudine Picq y Vincent Johnson por la edición técnica.
-

Contenido

Prólogo	5
1. Protocolos de crioconservación para meristemas de banano	8
1.1 Introducción	8
1.2 Crioconservación de meristemas apicales de banano	9
1.2.1 Material vegetal	10
1.2.2 Crioconservación a través de vitrificación por microgotas	11
1.3 Crioconservación de agregados de meristemas de banano (estructuras parecidas a la coliflor)	14
1.3.1 Material vegetal	14
1.3.2 Método sencillo de congelación	16
1.3.3 Vitrificación por microgotas de los agregados meristemáticos ‘parecidos a la coliflor’	18
2. Crioconservación de suspensiones de células embriogénicas de banano	21
2.1 Introducción	21
2.2 Material vegetal	22
2.2.1 Material inicial	22
2.3 Crioconservación de suspensiones de células	23
2.3.1 Precultivo	23
2.3.2 Crioprotección	23
2.3.3 Congelación y almacenamiento	23
2.3.4 Descongelación y recuperación	25
2.3.5 Prueba de viabilidad de las suspensiones de células	26
3. Crioconservación de embriones zigóticos de banano	27
3.1 Materiales y métodos	27
3.1.1 Precultivo	27
3.1.2 Deshidratación	28
3.1.3 Congelación	28
3.1.4 Descongelación y recuperación	28

4.	Discusión y perspectivas	29
4.1	Criopreservación de los meristemas de banano	29
4.1.1	Vitrificación por microgotas de los meristemas apicales de banano	29
4.1.2	Criopreservación de agregados de meristemas	30
4.1.3	Método sencillo de congelación	30
4.1.4	Vitrificación por microgotas de los agregados de meristemas ‘parecidos a la coliflor’	31
4.1.5	Optimización de protocolos	31
4.1.6	Criopreservación de la colección de bananos	33
4.2	Suspensiones de células	34
4.2.1	Pretratamientos	34
4.2.2	Crioprotección	34
4.2.3	Congelación	35
4.2.4	Tratamientos después de la congelación	35
	Apéndices	37
	Apéndice 1. Composición de medios y soluciones	39
	Apéndice 2. Equipo básico requerido	42
	Apéndice 3. Lista de abreviaturas	43
	Bibliografía	44
	Literatura adicional recomendada	47

Prólogo

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) representan dos de los grupos de cultivos más importantes en el mundo entero. Más de 400 millones de personas en los países en vías de desarrollo de los trópicos y subtropicos dependen de estos cultivos, sean estos alimentos básicos, o importantes productos para la venta, local e internacionalmente.

Los bananos y plátanos son cultivados casi exclusivamente por pequeños agricultores y la producción se basa en una amplia gama de variedades importantes localmente. Sin embargo, en muchas áreas esta producción está siendo restringida debido a la presión que ejercen las plagas y enfermedades. En respuesta a este hecho, varios programas de mejoramiento de bananos y plátanos alrededor del mundo están trabajando para producir variedades mejoradas, resistentes a plagas y enfermedades y de alto rendimiento.

La materia prima para el mejoramiento de los bananos son las especies silvestres de *Musa* y diversas variedades que se encuentran principalmente en Asia, centro de diversidad de *Musa*, pero también en África y América Latina. Estas especies y cultivares contienen los genes necesarios para una producción mejorada de manera sostenida de cara a los ataques de plagas y enfermedades y condiciones ambientales cambiantes. Para asegurar la disponibilidad de estos importantes recursos para el mejoramiento y producción futuros, es esencial conservar el germoplasma de *Musa* de manera segura.

Bioversity International (anteriormente INIBAP) es responsable por la colección mundial de germoplasma de *Musa*. Esta colección contiene más de 1100 accesiones, tanto de especies silvestres, como de variedades cultivadas, y es mantenida bajo los auspicios de la FAO. Esta colección se mantiene actualmente *in vitro*, en condiciones de baja intensidad de luz y bajas temperaturas, con el fin de reducir las tasas de crecimiento de los cultivos. A pesar de estas condiciones de crecimiento lento, aún es necesario hacer nuevos cultivos de todas las accesiones una vez al año en promedio. El proceso de recultivo es laborioso y se presta para que las accesiones sean contaminadas con hongos o bacterias. Además, las accesiones que se mantienen *in vitro*, aún bajo condiciones de crecimiento lento, están expuestas a la variación somaclonal.

Para superar estos problemas y asegurar la conservación a largo plazo de los recursos genéticos de *Musa*, Bioversity está apoyando la investigación en el área de la crioconservación, es decir, almacenamiento a temperaturas ultra bajas, usualmente las del nitrógeno líquido (-196°C). Este es el método a elegir para resguardar un almacenamiento a largo plazo rentable y seguro de los recursos genéticos de las especies que tienen semillas recalcitrantes o se propagan vegetativamente, como es el caso de *Musa*. Esta investigación se está llevando a cabo en la *Katholieke Universiteit*

Leuven, Bélgica (KULeuven), y las técnicas desarrolladas se utilizan ahora para la crioconservación habitual de las accesiones mantenidas por Bioversity. Actualmente, casi la mitad de la colección se conserva de manera segura a largo plazo en nitrógeno líquido. Esta colección crioconservada se considera un complemento de la colección *in vitro* y sirve como un respaldo seguro en caso de que las accesiones se pierdan debido a la contaminación, variación somaclonal y errores humanos durante el proceso de subcultivo.

Las técnicas de crioconservación en principio son aplicables a cualquier tipo de tejido vegetal con potencial de regeneración. Estas técnicas han sido desarrolladas para más de 200 especies de plantas diferentes, cultivadas de diversas maneras, incluyendo suspensiones celulares, callos, ápices, embriones somáticos y zigóticos (Reed 2008).

A partir de los bananos es posible obtener dos tipos de tejidos meristemáticos y regenerativos *in vitro*: (i) meristemas individuales aislados de los cultivos de puntas apicales y (ii) cultivos de meristemas altamente proliferantes que contienen agregados de meristemas parecidos a la coliflor. Los métodos de crioconservación han sido desarrollados para ambos tipos de tejidos.

En adición, suspensiones de células embriogénicas de diferentes cultivares pertenecientes a distintos grupos genómicos actualmente también se almacenan en nitrógeno líquido (Panis et al. 1990, Panis 1995, Panis et al. 2005b). El principal propósito de conservar las suspensiones de células embriogénicas de banano a largo plazo no es la conservación de la diversidad de los bananos. Como algunas de las accesiones de banano son recalcitrantes para el establecimiento de suspensiones de células embriogénicas, además de que este proceso consume mucho tiempo (hasta 15 meses), en este caso se debe considerar la crioconservación como un apoyo para las aplicaciones biotecnológicas como la ingeniería genética (Strosse et al. 2003).

En esta publicación se describen los diversos métodos, desarrollados en la KULeuven para la crioconservación de los cultivos de *Musa*. Se describen las ventajas y desventajas y se identifican las áreas donde aún se requieren investigaciones para optimizar los protocolos.

El propósito de esta publicación consiste en proporcionar información y guías con respecto a metodologías adecuadas de crioconservación para su uso en el germoplasma de *Musa*. Se espera que las descripciones detalladas de las metodologías faciliten su adopción y uso estandarizado en diferentes laboratorios.

La disponibilidad y el tipo de material inicial, los genotipos aptos para la crioconservación y la disponibilidad de los recursos, tendrán que ser considerados para determinar cual de estos métodos es el más apropiado para el uso en otros laboratorios.

1. Protocolos de crioconservación para meristemas de banano

1.1 INTRODUCCIÓN

Hasta hace 20 años, los protocolos de crioconservación para los tejidos vegetales se basaban principalmente en un congelamiento lento en presencia de mezclas crioprotectoras que contenían DMSO (sulfóxido de dimetilo), azúcares, glicerol y/o prolina. El congelamiento lento resulta en una congelación-deshidratación, dejando menos agua en las células que pudieran formar cristales de hielo letales durante la exposición a temperaturas extremadamente bajas.

Sin embargo, durante los últimos 20 años se han establecido varios nuevos procedimientos para la crioconservación, como la vitrificación, encapsulación-deshidratación, precultivo-deshidratación y encapsulación/vitrificación, todos ellos basados en la vitrificación. La vitrificación puede ser definida como la transición del agua directamente desde la fase líquida a una fase amorfa o vítrea, evitando así la formación de cristales de hielo. Los protocolos de crioconservación basados en las técnicas de vitrificación han sido desarrollados para diferentes cultivos de propagación vegetativa, incluyendo los bananos (Sakai and Engelmann 2007).

La investigación en la KULeuven apoyada por Bioersity dio como resultado el desarrollo de dos protocolos de crioconservación adecuados para el almacenamiento a largo plazo de los cultivos de meristemas de banano. El primer método se basa en un congelamiento rápido de los cultivos de meristemas altamente proliferantes precultivados durante dos semanas en un medio con 0.4 M (136.8 g/L) de sacarosa. El segundo también utiliza cultivos de meristemas altamente proliferantes precultivados en sacarosa, pero ellos reciben un tratamiento de vitrificación adicional. El tercer protocolo y el que se aplica de manera más general, es la vitrificación de los meristemas apicales extirpados de las plantas enraizadas *in vitro*. El trabajo que se requiere para crioconservar las accesiones, al igual que las tasas de regeneración después de descongelarlas, depende del cultivar y del método utilizado (Panis et al. 2007). La aplicación de los protocolos antes mencionados hasta la fecha ha dado como resultado el almacenamiento seguro en nitrógeno líquido de 655 accesiones (situación a finales de 2008) que pertenecen a diferentes grupos genómicos dentro del género *Musa*.

Detección de bacterias endofíticas

Durante el cultivo y almacenamiento de meristemas normales bajo condiciones de crecimiento limitado, raramente se observa la presencia de bacterias endógenas. Si se encuentran, a menudo estas bacterias no interfieren con el crecimiento de los cultivos de meristemas. Sin embargo, tan pronto como los meristemas se someten a crioconservación, el crecimiento

de las bacterias endógenas se vuelve un problema. Cuando los meristemas empiezan a crecer nuevamente después de la crioconservación, cualesquiera bacterias endógenas presentes pueden desarrollarse en colonias amarillas o blancas, cuyo crecimiento sobrepasa el meristema en recuperación. Por lo tanto, antes de someter los cultivos a la crioconservación, ellos son cribados para detectar la presencia de bacterias endofíticas en un medio desarrollado para el crecimiento de las bacterias (medio BACT) que contiene 23 g/L del caldo nutritivo Difco® Bacto, 10 g/L de glucosa y 5 g/L del extracto de levadura (van den Houwe y Swennen 2000). Estos platos se incuban por 3 semanas a plena luz a 28°C. Las accesiones que responden positivamente, son descartadas (Hamill et al. 2005, Thomas et al. 2008, Van den Houwe y Swennen 2000).

1.2 CRIOCONSERVACIÓN DE MERISTEMAS APICALES DE BANANO

La crioconservación de puntas apicales de banano cultivadas *in vitro* mediante la crioconservación por primera vez fue reportado por Thinh y colaboradores (Thinh et al. 1999). Utilizando este método, los porcentajes de regeneración a menudo fueron bajos e impredecibles. Por lo tanto, la técnica fue mejorada y adaptada en la KULeuven para poder aplicarla a una gran variedad de cultivos (Panis et al. 2005a).

Este método es ilustrado en la Figura 1 y los detalles se presentan a continuación.

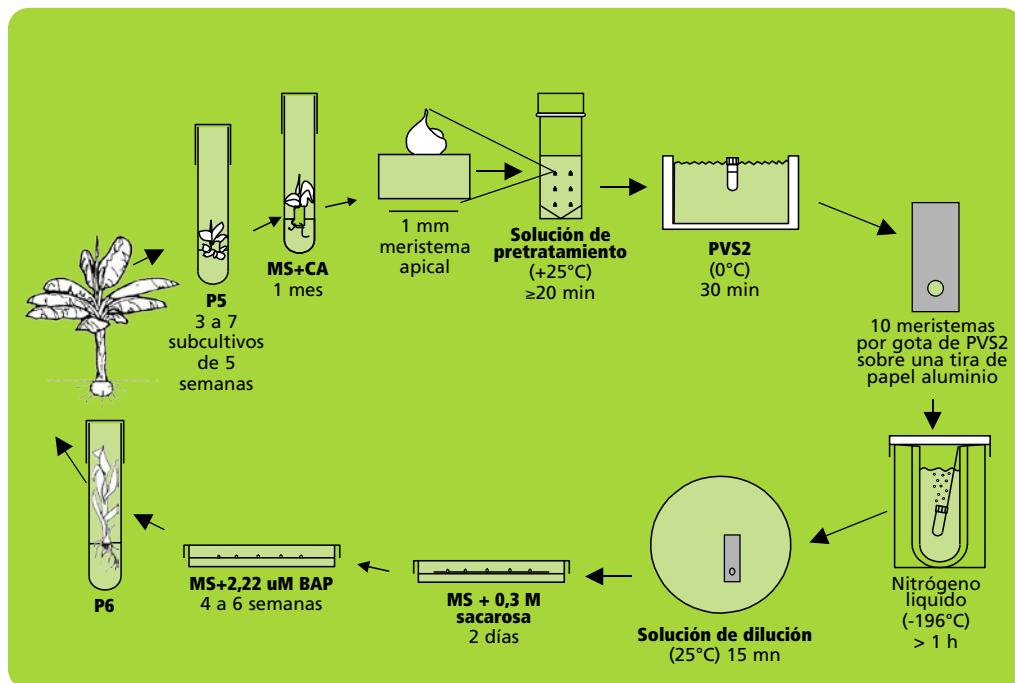


Figura 1. Crioconservación de meristemas individuales.

1.2.1 Material vegetal

Preparación de las plántulas *in vitro*

Todas las accesiones fueron obtenidas de la colección de germoplasma de *Musa in vitro* de Bioversity (KULeuven, Belgica). Esta colección contiene cultivares de banano comestibles, igual que sus parientes silvestres. Los cultivos apicales se siembran en 25 tubos de ensayo de 150 ml en 25 ml de medio P5. El medio P5 contiene el medio semisólido de Murashige y Skoog (MS) complementado con 30 g/L de sacarosa, 10 μM de BA y 1 μM de IAA y solidificado con 2 g/L de gelrite P5 (Banerjee y de Langhe 1985). Se cultivan a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo iluminación continua de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes blancos Osram de 36 W. El pH es ajustado a 5.8 previo al autoclavado. De estos cultivos multiplicados se separan brotes de 3 a 5 cm de largo que luego se transfieren a un medio de enraizamiento en tubos de ensayo. El medio de enraizamiento tiene la misma composición que el P5, pero desprovisto de fitoreguladores de crecimiento y complementado con 0.5 g/L de carbón activado. Después de un mes, se obtienen plantas *in vitro* robustas y bien enraizadas con un diámetro del cormo de 5 a 8 mm el cual proporciona una fuente apropiada para la escisión de meristemas apicales (Figura 2).

Disección y selección de meristemas apicales

Como en muchas otras monocotiledóneas, los meristemas apicales de banano están cubiertos con varias capas firmes de hojas inmaduras, de forma tubular y de color blancuzco. Los meristemas apicales individuales se cortan bajo un microscopio binocular. Las hojas son removidas una por una hasta que el domo apical esté visible, pero aún cubierto parcialmente por uno o dos primordios foliares jóvenes (ver Figuras 3 y 4). La base foliar



Figura 2. Producción de plantas robustas enraizadas *in vitro* del cv. de banano 'Williams'.

(tejido del cormo) es de 1 mm de diámetro. Para extirpar los pedazos de cormo exactamente de este tamaño, se coloca un papel milimetrado debajo del plato Petri plástico transparente esterilizado sobre el cual se extirpan los meristemas. Los meristemas diseccionados son transferidos en una solución pretratamiento (*loading*) (en la oscuridad a temperatura ambiente). Las puntas que están dañadas ligeramente o no se encuentran en la etapa correcta (por ejemplo el meristema está demasiado o poco cubierto por el primordio foliar) son excluidas de la criopreservación. Un técnico hábil y entrenado puede aislar un máximo de 10 meristemas por hora (aproximadamente, 6 minutos para aislar un meristema).

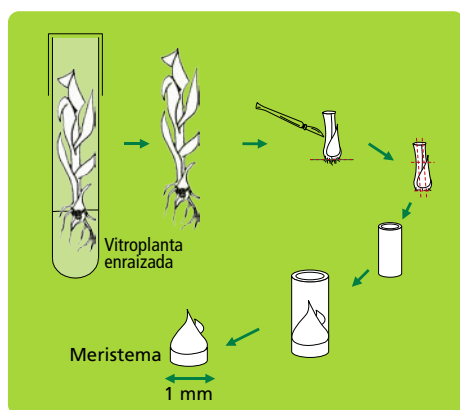


Figura 3. Ilustración del aislamiento del meristema. Las hojas son removidas una por una hasta que el domo apical esté visible pero aún parcialmente cubierto por uno o dos primordios foliares jóvenes.

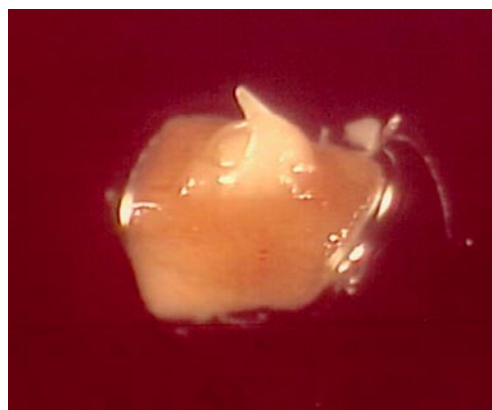


Figura 4. Meristemas apicales parcialmente cubiertos del cv. de banana 'Williams'.

1.2.2 Criopreservación a través de vitrificación por microgotas

Pretratamiento, deshidratación y congelación rápida

La solución esterilizada y filtrada de pretratamiento contiene 2 M de glicerol y 0.4 M (= 136.8 g/L) de sacarosa disueltos en el medio MS (pH 5.8). Los meristemas extirpados se dejan en la solución pretratamiento en un recipiente plástico de 20 ml hasta diseccionarlos a todos. Por lo tanto, el tiempo de exposición varía entre 20 minutos y 5 horas. Una investigación anterior mostró que la regeneración de los meristemas de banana no está influenciada por el tiempo de exposición en la solución pretratamiento (Panis et al. 2005a). Aunque el mecanismo preciso de pretratamiento aún no se entiende completamente, se ha comprobado para diferentes especies de plantas que el pretratamiento puede mejorar dramáticamente la tolerancia de meristemas aislados a la deshidratación por la solución vítrea (Matsumoto et al. 1994, Takagi et al. 1997).

Después del pretratamiento, la solución es reemplazada por la solución PVS2 muy fría. La solución PVS2 consiste de 30% (w/v) (3.26 M) de glicerol, 15% (w/v) (2.42 M) de etilen glicol (EG), 15% (w/v) (1.9 M) de DMSO y 0.4 M (= 136.8 g/L) de sacarosa (Sakai et al. 1990). Todos estos compuestos están disueltos en el medio MS, con pH ajustado a 5.8 seguido por una esterilización por filtro. Los meristemas son sometidos a la solución PVS2 por un periodo de 30 a 40 min a 0°C. Cinco minutos antes de finalizar el tratamiento, 10 meristemas se transfieren individualmente a una microgota de la solución PVS2 (de unos 15 μ l) en una cinta de papel aluminio (5x20 mm) con una pipeta plástica Pasteur de 2 ml (Figura 5). Para mantener la temperatura de la cinta de alrededor de 0°C durante las manipulaciones, la cinta de papel aluminio se pone en un plato Petri plástico colocado encima de un elemento de enfriamiento congelado. Después del tratamiento con la solución PVS2, la cinta de papel aluminio se sumerge en nitrógeno líquido con un fórceps fino. Para un crioalmacenamiento permanente, el papel aluminio congelado es transferido rápidamente a un criotubo de 2ml llenado con nitrógeno líquido y cerrado.



Figura 5. Transferencia de meristemas a una microgota de solución PVS2 (de unos 15 μ l) sobre una tira de papel aluminio (5x20 mm) con una pipeta Pasteur de 2 ml.

Almacenamiento, descongelación y post-tratamiento (unloading)

Los meristemas se mantienen en nitrógeno líquido por al menos 20 min. Para la descongelación, las cintas de papel aluminio se enjuagan en 10 ml de solución post-tratamiento en un pequeño plato Petri a temperatura ambiente. Después de pocos segundos, los meristemas se separan del papel aluminio y se mantienen por otros 15 min en la solución post-tratamiento. Como tal, la solución tóxica PVS2 es removida durante la descongelación y reemplazada por una solución post-tratamiento menos tóxica. La solución post-tratamiento consiste de 1.2 M (= 410.4 g/L) de sacarosa disuelta en el medio MS (pH 5.8).

Recuperación

Después del post-tratamiento, los meristemas son colocados en dos hojas de papel de filtro esterilizadas encima de un medio MS semisólido libre de hormonas, que contiene 0.3 M (=102.6 g/L) de sacarosa. Después de dos días, los meristemas son transferidos al medio de regeneración sin papel filtro. La primera semana de cultivo siempre tiene lugar en la oscuridad. De cuatro a seis semanas después de la crioconservación, se puede distinguir cuatro tipos de reacción:

- (i) puntas apicales blancas que son el resultado de la muerte inmediata del tejido sin ennegrecimiento;
- (ii) puntas apicales negras completa o parcialmente, indicando que hubo una reacción enzimática después de la crioconservación (producción y oxidación de polifenoles);
- (iii) crecimiento desorganizado de callos representando la excrecencia de pequeñas áreas aisladas del domo apical y/o tejidos de primordio; y
- (iv) regeneración de meristemas resultando de la supervivencia de una parte sustancial del domo apical (Figuras 6a-d).

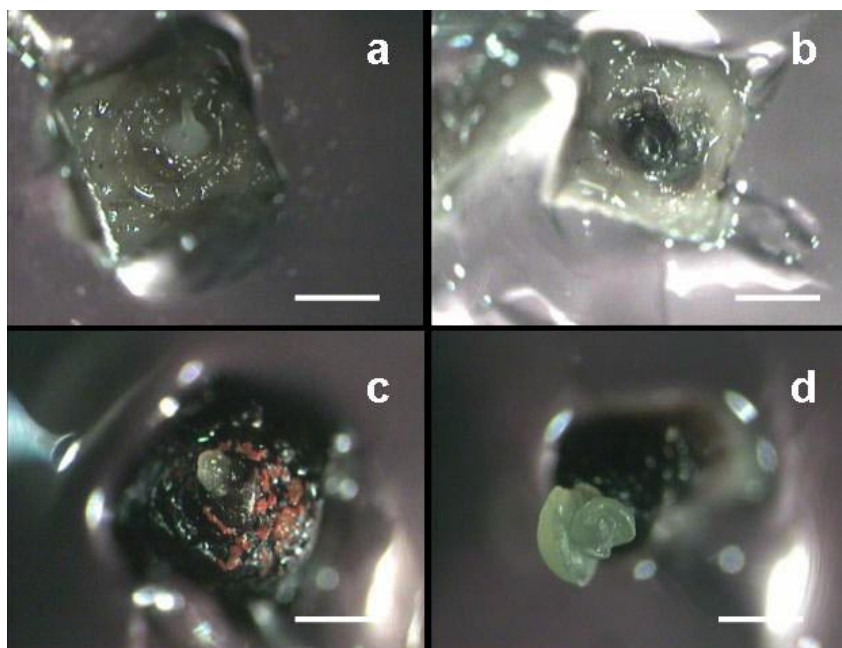


Figura 6. Reacción de meristemas apicales a la crioconservación 30 días después de la descongelación (a) No hubo crecimiento; el meristema permanece de color blanco; (b) Ennegrecimiento sin crecimiento posterior; el domo apical reacciona formando compuestos polifenólicos que lo oxidan; (c) Formación de callos; callos acuosos, no morfogénicos; y (d) Regeneración de los brotes (barra = 600 μ m).

Un mes después de la descongelación, se puede observar un brote de 0.5 cm de largo (Figura 7). Los callos nunca producen brotes.



Figura 7. Brotes recuperados a partir de meristemas apicales crioconservados del cv. de banano 'Williams' un mes después de la descongelación.

1.3 CRIOCONSERVACIÓN DE AGREGADOS DE MERISTEMAS DE BANANO (ESTRUCTURAS PARECIDAS A LA COLIFLOR)

Un segundo tipo de tejido meristemático regenerativo en banano, el cual ha sido crioconservado exitosamente, se refiere a los agregados meristemáticos altamente proliferantes (algunas veces llamados agregados parecidos a la coliflor). Este tipo de tejido originalmente fue producido como material inicial para empezar cultivos de suspensiones de células embriogénicas en bananos (Dhed'a et al. 1991, Schoofs 1997, Strosse et al. 2006).

Dos técnicas de crioconservación aplicadas a los cultivos de meristemas altamente proliferantes 'parecidos a la coliflor' se describen a continuación:

- Método sencillo de congelamiento (que incluye un precultivo en sacarosa) (Panis et al. 1996),
- Vitricación por microgotas de los agregados meristemáticos 'parecidos a la coliflor' (combinando el precultivo con vitricación por microgotas) (Panis et al. 2000b, Agrawal et al. 2004).

1.3.1 Material vegetal

Producción de agregados meristemáticos 'parecidos a la coliflor'

Los experimentos preliminares revelaron que el nuevo crecimiento de los grupos meristemáticos después de la crioconservación puede tener éxito sólo utilizando los agregados 'parecidos a la coliflor'. Para producir este

tipo de material en todas las accesiones de *Musa*, los cultivos de meristemas se transfieren a un medio que contiene una alta concentración de BA (medio P4, ver Apéndice 1). Cada uno a dos meses, el material se somete al procedimiento de subcultivo y los pequeños agregados de meristemas ‘parecidos a la coliflor’ son seleccionados y transferidos a un medio fresco (Strosse et al. 2006). La alta concentración de BA en el medio P4 (hasta 100 μM) inhibe el crecimiento excesivo de los meristemas, favoreciendo de este modo la formación de numerosos domos apicales de color blanco (Figura 8). Es necesario repetir el subcultivo y el proceso puede tomar de 4 a 12 meses.

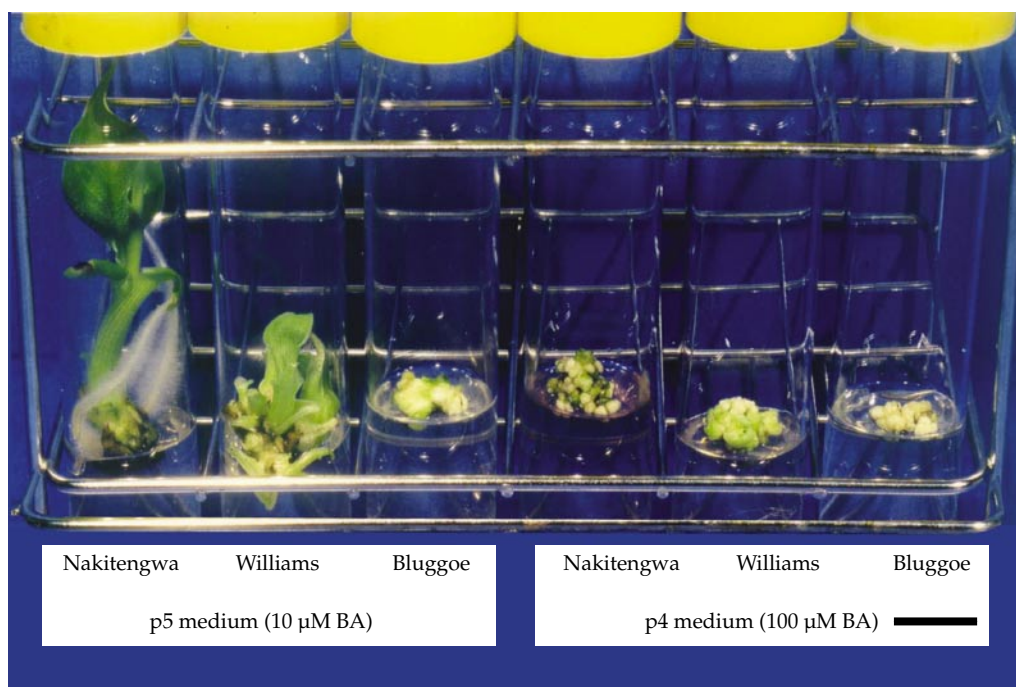


Figura 8. Cultivos de meristemas de los cultivares de banano Nakitengwa (banano de altiplanos AAA), Williams (grupo AAA) y Bluggoe (grupo ABB) en el medio P5 (que contiene 10 μM de BA) (izquierda) y (derecha) medio P4 (que contiene 100 μM de BA) (barra = 2 cm).

Precultivo de agregados meristemáticos

Luego de la aparición de los agregados ‘parecidos a la coliflor’ y 4 semanas después del último subcultivo, se recortan los agregados meristemáticos blancos de unos 4 mm de diámetro, cada uno conteniendo al menos cuatro domos apicales, y se transfieren a un medio de precultivo (P5 + 0.4 M (= 136.8 g/L) de sacarosa) por 4 semanas. Se cultivan a 25°C \pm 2°C en la oscuridad.

1.3.2 Método sencillo de congelación

Este método es ilustrado en la Figura 9.

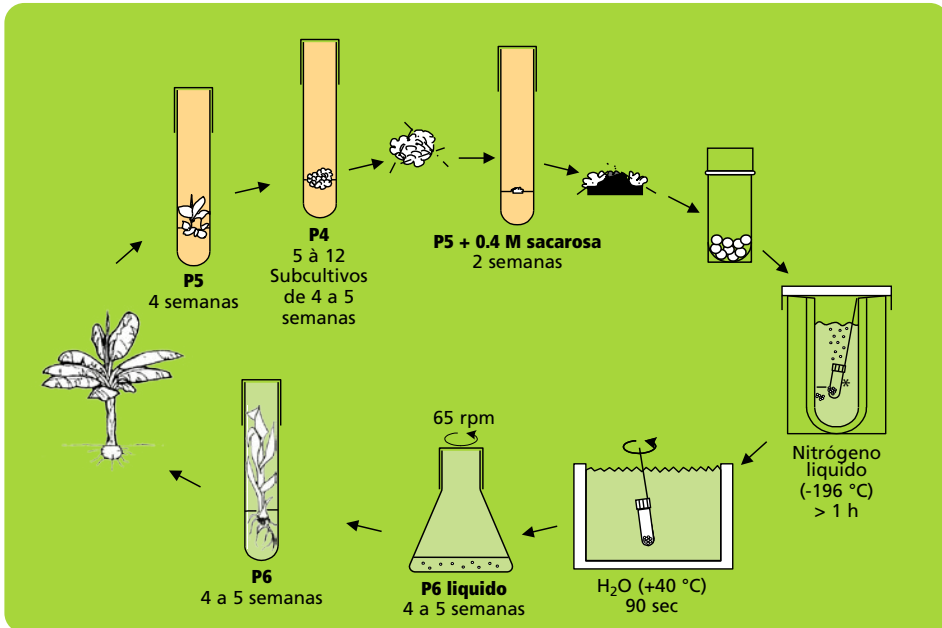


Figura 9. Protocolo de congelación sencilla.

Crioconservación

Pequeños agregados meristemáticos de color blanco de 5-15 mg (2-3 mm de diámetro), que contienen de 3 a 6 domos meristemáticas, se extirpan de los brotes precultivados (Figura 10). Se remueven los tejidos de color marrón y sólo se retienen las partes más sanas, como lo indica el color blanco amarillento. Los agregados se transfieren a criotubos esterilizados (2 ml) sin

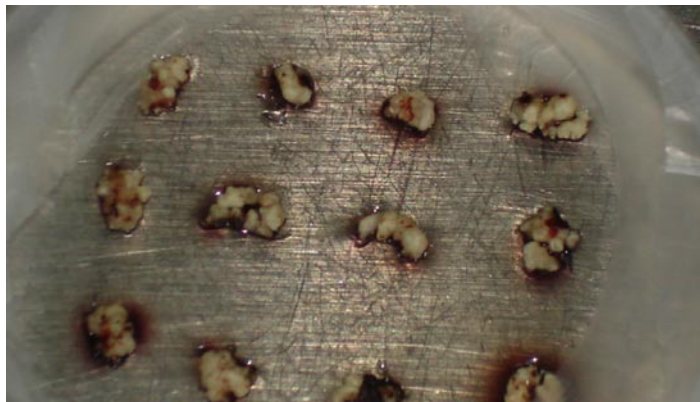


Figura 10. Agregados meristemáticos precultivados de *Musa schizocarpa*.

ninguna solución líquida y se sumergen directamente en un frasco Dewar que contiene nitrógeno líquido. Cada criotubo contiene de 7 a 10 agregados. En esta etapa, las muestras pueden ser almacenadas por un término largo al transferir los criotubos a un tanque con nitrógeno líquido, asegurando que su transferencia de un contenedor a otro transcurra con la mayor rapidez (dentro de unos pocos segundos), previniendo de esta manera la descongelación letal de las muestras.

Descongelación y recuperación

Después del almacenamiento, la descongelación rápida se realiza revolviendo el criotubo congelado en un baño María o en un vaso con agua a 40°C por 90 segundos.

La regeneración de los meristemas congelados puede ser efectuada de dos maneras diferentes:

- Los meristemas se transfieren a platos Petri de 9 cm que contienen el medio de regeneración semisólido (P6) y sellados con parafilm.
- Alternativamente, la regeneración puede ser realizada en un medio líquido. Los meristemas descongelados se transfieren a frascos Erlenmeyer de 100 ml que contienen 30 ml de medio de regeneración líquido (P6 sin agentes solidificantes) y se colocan en un agitador rotativo a 70 rpm.

Después de una semana de cultivo en condiciones de oscuridad, los platos Petri y los frascos se transfieren a una luz continua a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los cultivos se mantienen todo el tiempo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tres semanas después de la transferencia al medio de regeneración, el nuevo crecimiento de los meristemas congelados se determina bajo un microscopio binocular. Se distinguen dos tipos de tejidos supervivientes, es decir, brotes y callos no regenerados. Los callos son sistemáticamente eliminados y sólo los brotes recuperados (Figura 11) se transfieren a los tubos de ensayo con el medio de regeneración para promover el consiguiente desarrollo de plantas

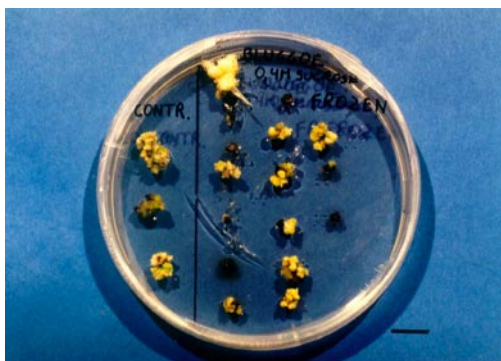


Figura 11. Plato Petri que contiene racimos meristemáticos testigo (izquierda) y congelados (derecha) del cv. Bluggoe (grupo ABB), 8 semanas después de la crioconservación (barra = 1 cm).

enteras. Tan pronto las plantas enraizadas alcanzan el tamaño suficiente, se siembran en el suelo.

1.3.3 Vitrificación por microgotas de los agregados meristemáticos 'parecidos a coliflor'

Este método es ilustrado en la Figura 12. El pretratamiento, la deshidratación, congelación rápida, almacenamiento, descongelación y postratamiento son casi idénticos a la vitrificación por microgotas descrita en el párrafo 1.2. Por lo tanto, abajo presentamos sólo los pasos esenciales (y distintos).

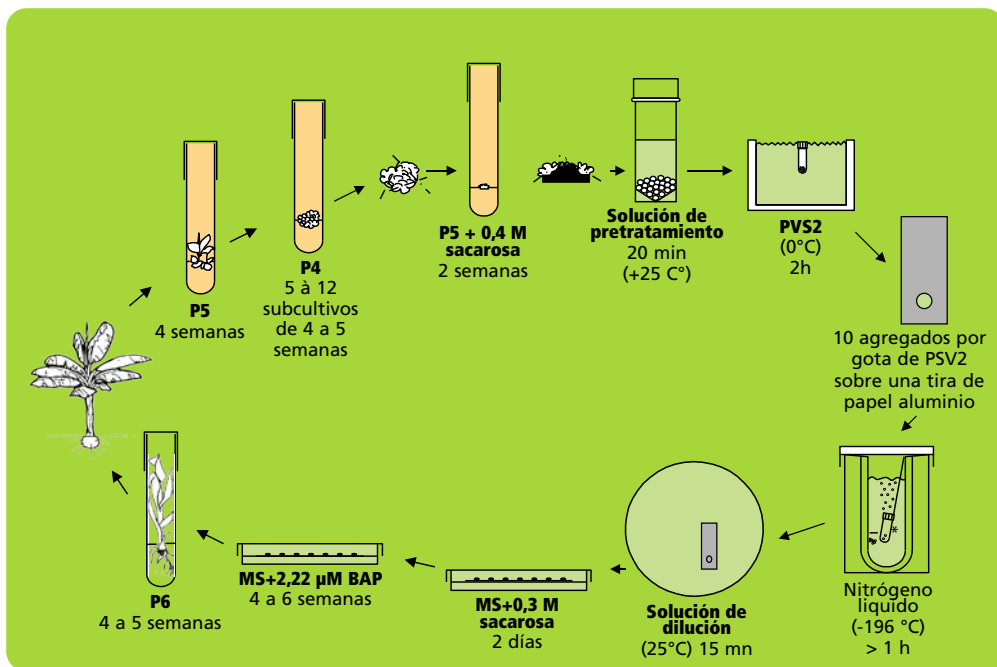


Figura 12. Protocolo de vitrificación por microgotas de los agregados meristemáticos.

Pretratamiento, deshidratación y congelación rápida

Los agregados de meristemas extirpados se dejan en una solución de pretratamiento (Apéndice 1) en un recipiente plástico de 20 ml hasta que todos ellos estén cortados. De este modo, el tiempo de exposición varía entre 20 minutos y 3 horas.

Después del pretratamiento, la solución es reemplazada por 5 ml de solución PVS2 fría (Apéndice 1). Los agregados de meristemas se someten a la solución PVS2 por un período de 2 horas a 0°C. Cinco minutos antes de terminar el tratamiento, unos 10 agregados meristemáticos se transfieren a una microgota de la solución PVS2 colocada sobre una tira de papel aluminio (5x20 mm) con

un fórceps y una pipeta Pasteur plástica de 2 ml (Figura 13). Para mantener la temperatura de la tira de papel aluminio alrededor de los 0°C durante las manipulaciones, ella se coloca en un plato Petri plástico puesto sobre un elemento congelado. Después del tratamiento con PVS2, la tira de papel aluminio se sumerge en nitrógeno líquido con un fórceps muy fino. Para el criolmacenamiento permanente, el papel aluminio congelado se transfiere rápidamente a un criotubo de 2 ml con el nitrógeno líquido, que se sella.



Figura 13. Agregados meristemáticos en una microgota de la solución PVS2 (de unos 15 μ l) sobre una tira de papel aluminio (5x20 mm).

Almacenamiento, descongelación y postratamiento

Los agregados de meristemas se mantienen en el nitrógeno líquido al menos por 20 minutos. Para descongelar, las tiras de papel aluminio se sumergen en 10 ml de solución postratamiento (Apéndice 1) en un pequeño plato Petri a temperatura ambiente. Después de pocos segundos, los agregados meristemáticos se separan del papel aluminio y se mantienen por otros 15 minutos en la solución postratamiento. Como tal, la solución tóxica PVS2 es removida durante la descongelación y reemplazada por una solución postratamiento menos tóxica.

Regeneración

Los agregados meristemáticos congelados se remueven de la solución postratamiento y se colocan en platos Petri de 9 cm sobre dos capas de papel filtro esterilizado encima de unos 25 ml del medio MS semisólido libre de hormonas, que contiene 0.3 M (= 102.6 g/L) de sacarosa.

Después de dos días, el papel filtro se remueve y los agregados meristemáticos se transfieren a platos Petri con un medio MS complementado con 2.22 μ M de BA. La primera semana de cultivo siempre tiene lugar en la oscuridad. Después de un máximo de seis semanas, los agregados meristemáticos se transfieren a los tubos de ensayo con el medio P6 para el posterior desarrollo de plantas enteras (Figura 14).

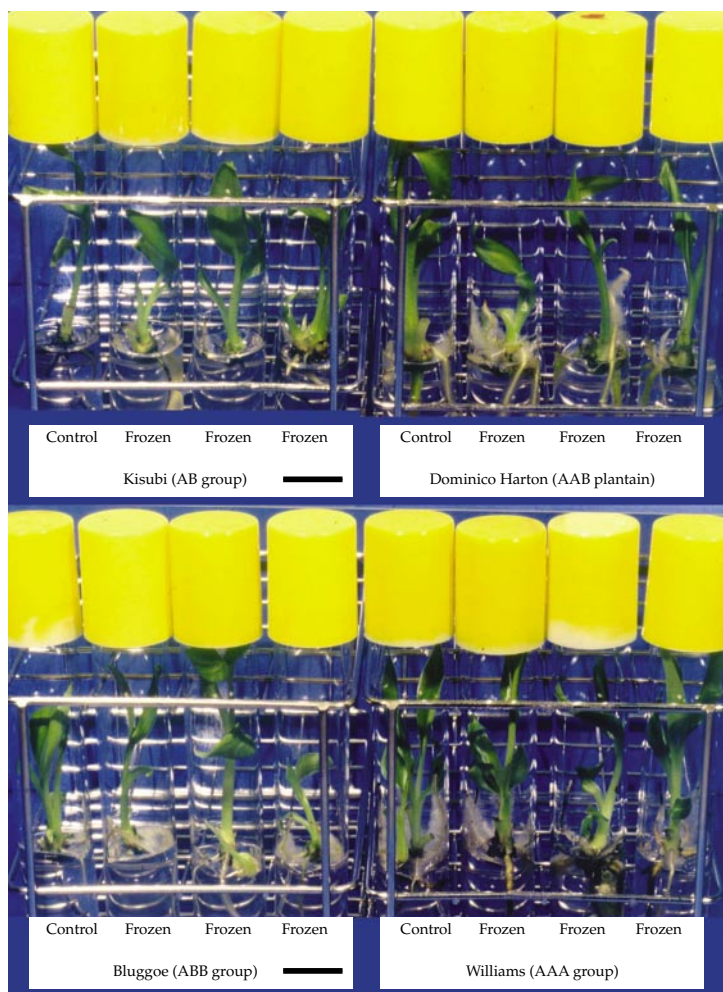


Figura 14. Brotes regenerados de los meristemas proliferantes, uno del testigo y tres de los congelados, de los cultivares 'Kisubi' (grupo AB), 'Dominico Harton' (plátano AAB), 'Bluggoe' (grupo AAB) y 'Williams' (grupo AAA) tres meses después de la crioconservación.

2. Crioconservación de suspensiones de células embriogénicas de banano

2.1 INTRODUCCIÓN

Ya que la mayoría de las variedades cultivadas de banano son altamente estériles, los programas clásicos de mejoramiento son muy lentos y laboriosos. Además, en el acervo génico de los bananos no se dispone de fuentes de resistencia contra algunos de los patógenos, como lo son los virus. Por lo tanto, la ingeniería genética ofrece una alternativa acogida para el mejoramiento de los bananos. En monocotiledóneas, las suspensiones de células embriogénicas a menudo representan el material de elección para la transformación, particularmente, en los cultivos estériles como el banano, donde los embriones zigóticos no se encuentran disponibles. Las suspensiones de células embriogénicas actualmente representan la única fuente de protoplastos regenerativos en banano (Panis et al. 1993). Al someterlos a la electroporación, los protoplastos derivados de las suspensiones de células embriogénicas originan una alta frecuencia de expresión transitoria de los genes marcadores introducidos (Sagi et al. 1994). Las células en suspensión rodeadas de paredes pueden ser exitosamente transformadas mediante bombardeo con partículas (Sagi et al. 1995) y *Agrobacterium* (Hernandez et al. 1998, Remy et al. 2005). De esta manera, se introdujo en los bananos la codificación de genes con el fin de obtener nuevos tipos de proteínas antifungosas, igual que la resistencia a los virus.

El principal cuello de botella para la transformación sigue siendo la iniciación de suspensiones celulares de buena calidad, es decir, suspensiones homogéneas de células embriogénicas con una alta frecuencia de regeneración. La iniciación de estos cultivos de suspensiones es difícil y consume mucho tiempo, independientemente del material de iniciación utilizado (flores masculinas inmaduras, embriones zigóticos inmaduros o meristemas proliferantes *in vitro*). Una vez establecidas, estas valiosas suspensiones celulares están sujetas a variación somaclonal y contaminación microbiana. Además, un prolongado período de cultivo puede dar como resultado una disminución y eventualmente una pérdida total de la capacidad morfogénica (Strosse et al. 2006, Strosse et al. 2003).

En 1990, se desarrolló una técnica de crioconservación para suspensiones celulares 'ideales' que involucra una crioprotección con 7.5% de DMSO (sulfóxido de dimetilo) por 1 hora a 0°C, seguida por una congelación lenta a 1°C/minuto hasta -40°C e inmersión en nitrógeno líquido. Una suspensión 'ideal' de células embriogénicas contiene una alta proporción de células isodiamétricas caracterizadas por un núcleo relativamente grande, vacuolas pequeñas y granos de almidón y proteínas mínimos (Figura 15). Posteriormente, este protocolo de crioconservación fue optimizado con el fin de aplicarlo a células de banano menos 'ideales' pero también altamente

regenerativas (Panis et al. 2000a). Las suspensiones menos 'ideales' son más heterogéneas y pueden contener, además de los agregados de células embriogénicas, células con vacuolas grandes y alargadas, células con un citoplasma muy denso, pero granular, o células con grandes granos de almidón y glóbulos organizados. Recientemente, fueron recuperadas suspensiones celulares de banano después de 15 años de almacenamiento

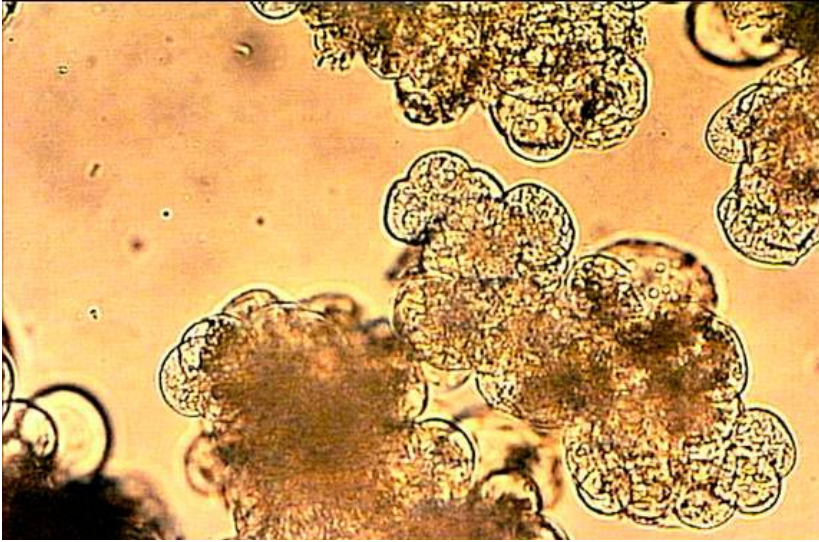


Figura 15. Suspensiones de células embriogénicas del cultivar Bluggoe (grupo ABB).

en nitrógeno líquido (resultados no publicados). La habilidad de producir embriones somáticos permanece intacta. También se pudo iniciar suspensiones de células embriogénicas a partir de material congelado. Estas suspensiones reiniciadas demostraron retener su aptitud comparable con los testigos no congelados (Panis et al. 2005b).

2.2 MATERIAL VEGETAL

2.2.1 Material inicial

Los estudios más recientes publicados sobre la crioconservación de las suspensiones de células de banano, muestran algunas diferencias en los procedimientos dependiendo del tejido utilizado como material inicial para empezar las suspensiones celulares. En estas guías se considerarán dos diferentes tipos de suspensiones: (i) suspensiones derivadas de las flores masculinas (Côte et al. 1996) y (ii) suspensiones derivadas de los cultivos de meristemas proliferantes (Schoofs 1997, Strosse et al. 2006, Strosse et al. 2003).

Suspensiones de células derivadas de los cultivos de meristemas proliferantes

Las suspensiones celulares se mantienen en un medio líquido ZZ (Apéndice 1) en un vibrador rotativo a unas 70 rpm y a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Suspensiones de células derivadas de las flores masculinas

Las suspensiones celulares se mantienen en un medio líquido MA2 (Apéndice 1).

2.3 CRIOCONSERVACIÓN DE SUSPENSIONES DE CÉLULAS

2.3.1 Precultivo

Este paso se recomienda solo para las suspensiones celulares derivadas de flores masculinas. Las células se cultivan por 24 horas en un MA2 líquido complementado con 180g/L de sacarosa.

2.3.2 Crioprotección

Las suspensiones de células se crioconservan siempre y cuando se encuentren en su fase de crecimiento exponencial. El crecimiento celular exponencial usualmente tiene lugar de 7 a 10 días después del último subcultivo.

Se les permite a las células establecerse en un tubo graduado de centrífuga y se remueve el medio viejo.

Se añade el nuevo medio líquido ZZ¹ con 180 g/L de sacarosa hasta obtener un volumen final de células establecidas de 30%.

Un volumen igual del medio estéril ZZ¹ +180 g/L de sacarosa que contiene 15% (v/v) de sulfóxido de dimetilo (DMSO) se transfiere gradualmente a la suspensión concentrada de células durante un período de una hora a temperatura ambiente.

Como tal, la solución crioprotectora final, en soluciones derivadas tanto de flores masculinas, como de los cultivos meristemáticos, contiene 7.5% de DMSO y 180 g/L de sacarosa.

2.3.3 Congelación y almacenamiento

Para una congelación lenta, algunos laboratorios utilizarían congeladores electrónicos programables donde el refrigerante es el nitrógeno líquido. Ya que al autor no conoce laboratorios que hayan aplicado este equipo para las células de banano, aquí se discute sólo el uso del baño de metanol y el Contenedor de Congelación Nalgene™ cryo 1°C

¹ El medio ZZ es reemplazado por el medio MA2 cuando se utilizan células procedentes de flores masculinas.

Congelación lenta en baño de metanol

Muestras de 1.5 ml de suspensiones de células crioprotegidas se transfieren a criotubos de 2 ml y se colocan en un baño de metanol agitado (Cryocool CC-60, Exatrol y agitador de Neslab, Portsmouth, New Hampshire, EEUU). Este baño de metanol se refresca a una tasa de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ desde temperatura ambiente hasta -40°C .

Tan pronto se obtiene la temperatura de -7.5°C , los criotubos se sumergen por 3 segundos en nitrógeno líquido para iniciar la cristalización del medio protector. Luego los criotubos se enfrían hasta -40°C . Después de 30 minutos a -40°C , los criotubos se sumergen en nitrógeno líquido (-196°C) para el almacenamiento posterior.

Congelación lenta utilizando el contenedor de congelación Nalgene™ cryo 1°C

Los criotubos que contienen 2 ml de suspensiones de células crioprotegidas se colocan en un contenedor de congelación Nalgene™ cryo 1°C . Este sencillo dispositivo para congelación consiste de un contenedor plástico que contiene 250 ml de isopropanol (Figura 16). Su transferencia a un congelador (-80°C) permite una tasa de enfriamiento de alrededor de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

En ambos casos, la disminución de la temperatura dentro del criotubo dentro del contenedor de congelación es controlada utilizando una sonda de temperatura que se coloca en un criotubo testigo que contiene 1.5 ml del medio crioprotector.



Figura 16. Congelación lenta utilizando Nalgene™ cryo 1°C con sonda de temperatura.

2.3.4 Descongelación y recuperación

Después del almacenamiento, los criotubos se descongelan rápidamente en un vaso con agua esterilizada a 40°C por unos 1.5 a 2 minutos hasta derretirse la mayor parte de hielo.

Suspensiones de células derivadas de los cultivos de meristemas proliferantes

Las células descongeladas se colocan en un medio semisólido ZZ o RD1 (Apéndice 1) en platos Petri de 90 mm. El medio RD1 se aplica cuando se requiere obtener plántulas regeneradas a partir del material crioconservado. El medio semisólido ZZ se utiliza cuando se debe restablecer un cultivo de suspensiones de células embriogénicas. Durante la primera semana después de la crioconservación, los platos Petri siempre se colocan en un lugar oscuro (Figuras 17 A, B, C).

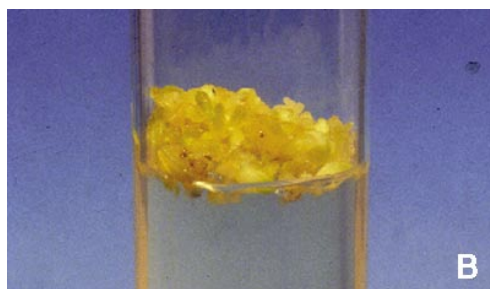


Figura 17. (A) Nuevo crecimiento después de 4 semanas en un medio semisólido de suspensiones de células embriogénicas no congeladas (izquierda) y congeladas (derecha) de 'Bluggoe' (grupo ABB); (B) Masa de embriones somáticos que se originan a partir de un cultivo de células congeladas; (C) Plantas de invernadero obtenidas a partir de una suspensión de células congeladas.

Suspensiones de células derivadas de flores masculinas

Las células descongeladas se colocan en un medio semisólido MA2 por 24 horas en los platos Petri de 90 mm. Después de 24 horas, las células se transfieren a un medio MA3 para el consiguiente desarrollo de los embriones somáticos regenerados a partir de la suspensión de células, o a un medio MA2 cuando se debe restablecer un cultivo de suspensiones de células embriogénicas.

2.3.5 Prueba de viabilidad de las suspensiones de células

La viabilidad química de las células se determina mediante una prueba de diacetato fluorescente (FDA) (Widholm 1972), ya que las células supervivientes muestran un gran brillo fluorescente bajo la iluminación ultravioleta (Figura 18).

Si no se dispone de un microscopio fluorescente, se puede aplicar la prueba de reducción de cloruro 2,3,4-trifenilo de tetrazolio (TTC) (Dixon 1985). Las células supervivientes convierten el TTC incoloro en cristales de formazán rojos que pueden ser observados bajo un microscopio ordinario.

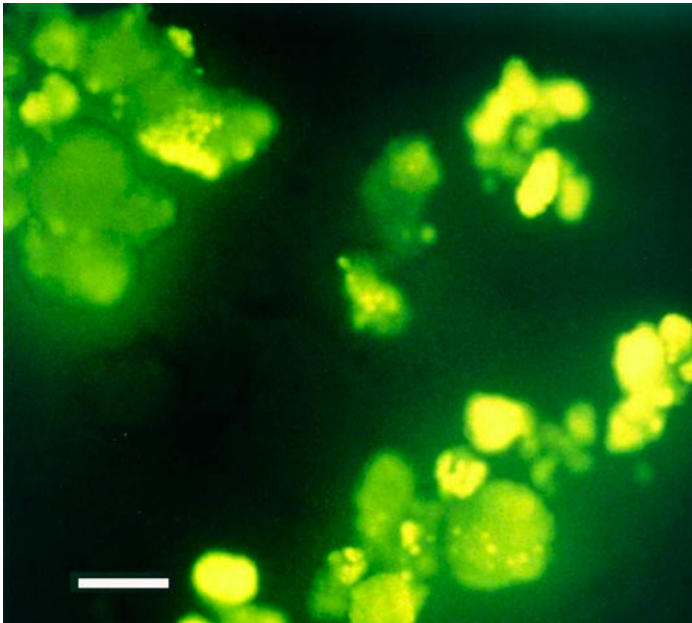


Figura 18. Suspensión de células embriogénicas del cv. 'Bluggoe' (grupo ABB), crioprotegida con 5% (v/v) de DMSO, congelada en nitrógeno líquido, teñida con FDA y observada bajo una luz ultravioleta. Las pequeñas células embriogénicas muestran un gran brillo fluorescente, mientras que las estructuras más grandes muestran una fluorescencia más difusa (barra = 100 μ m).

3. Crioconservación de embriones zigóticos de banano

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Este método de crioconservación requiere de embriones zigóticos desarrollados completamente extraídos de las semillas maduras de *Musa*. La fruta es cepillada y lavada con agua corriente y jabón líquido. A continuación, la fruta se esteriliza con un blanqueador comercial de 20% (v/v) por cinco minutos y se enjuaga tres veces con agua esterilizada.

El banano se pela bajo condiciones asépticas utilizando un gabinete de flujo laminar. Después de extraer las semillas, se aísla el embrión zigótico utilizando un microscopio estereoscópico. Debido a que el embrión zigótico se localiza justamente por debajo del 'opérculo', es importante utilizar el escalpelo y hacer un corte longitudinal muy preciso alrededor del 'tapón del micropilo' (Figura 19).

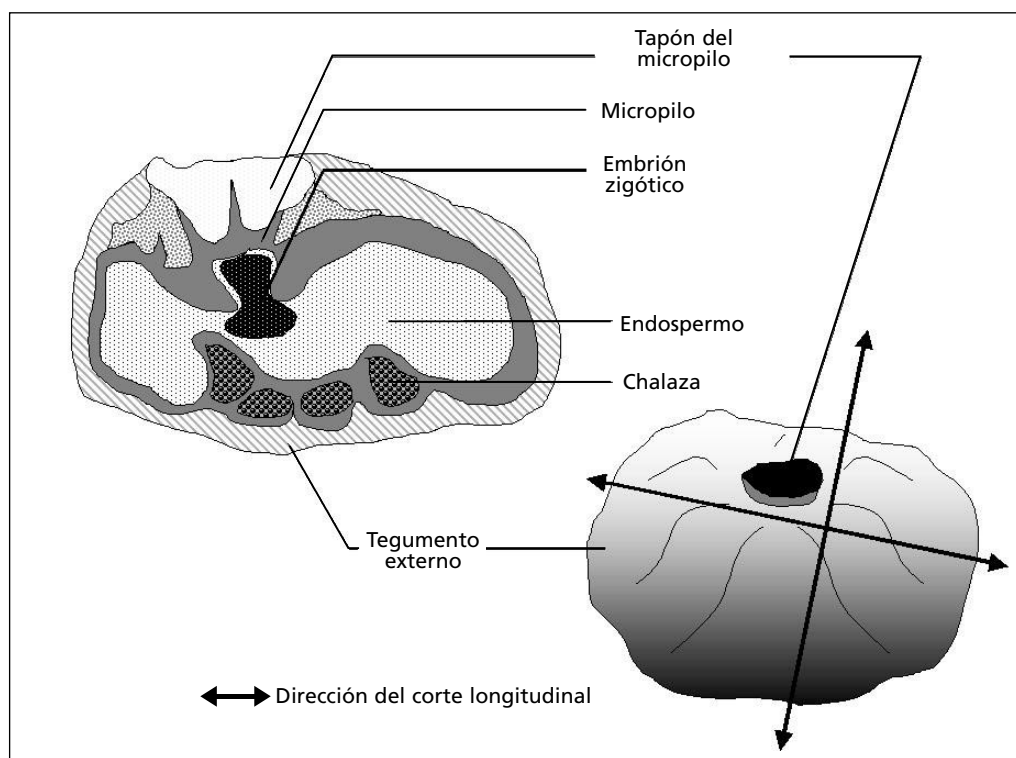


Figura 19. Representación gráfica del corte longitudinal de una semilla de banano.

3.1.1 Precultivo

Los embriones se transfieren por 5 horas en el medio descrito por Escalant y Teisson (1987) que consiste de nutrientes minerales de Murashige y Skoog con

macroelementos a mitad de su poder, vitaminas de Morel, 60 g/L de sacarosa, y 2 mg/L de gelrite. El pH se ajusta a 5.8 previo a someterlos a la autoclave.

3.1.2 Deshidratación

Luego, los embriones se deshidratan bajo el aire esterilizado de un gabinete de flujo laminar. No obstante, dependiendo tanto de las condiciones de laboratorio como de la especie de banano, el período de desecamiento puede requerir algunos ajustes (ver Tabla 1). Por lo tanto, se recomienda tener un estimado del tiempo requerido para obtener un contenido de agua de alrededor de 14% (% de peso fresco) en los embriones, ya que se comprobó que este contenido de agua es óptimo y proporciona la tasa más alta de recuperación después de la descongelación. Para *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, este contenido de agua se logra después de 1.5 y 2 horas de deshidratación, respectivamente.

3.1.3 Congelación

La congelación de los embriones se realiza en criotubos de 2 ml mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido.

3.1.4 Descongelación y recuperación

Tabla 1. Evolución del contenido de agua de embriones extirpados de *Musa acuminata* y *M. balbisiana* como una función de duración de deshidratación.

Tiempo (h)	Contenido de agua (% de peso fresco)*	
	<i>M. acuminata</i>	<i>M. balbisiana</i>
0	64	79
0.5	26	37
1.0	20	28
1.5	15	19
2.0	11	14
2.5	8	11
3.0	6	9

(*) Promedio de 3 experimentos con 3 réplicas de 12 embriones cada una.

Los embriones se descongelan rápidamente calentando los frascos con muestras en baño María a 40°C por unos 2 minutos. Para la regeneración, los embriones se colocan en el medio descrito anteriormente (Escalant and Teisson 1987) complementado con 0.5 mg/L de BA. Los cultivos se mantienen en la oscuridad por un período de cuatro semanas aproximadamente. Luego, los embriones germinados se transfieren al medio de enraizamiento y desarrollo (medio MS sin hormonas).

En vista de su eficacia y simplicidad, la técnica de crioconservación establecida para los embriones de *M. acuminata* y *M. balbisiana* podría ser aplicada con utilidad en el futuro para el almacenamiento a largo plazo del germoplasma de los diploides fértiles de *Musa*.

4. Discusión y perspectivas

4.1 CRIOCONSERVACIÓN DE LOS MERISTEMAS DE BANANO

4.1.1 Vitrificación por microgotas de los meristemas apicales de banano

Varios genotipos diferentes de *Musa* han sido crioconservados utilizando este protocolo (Thin et al. 1999, Panis et al. 2005a). Los porcentajes de regeneración después de la descongelación varían entre 20 y 85% (con un promedio de 53%). Estos porcentajes de recuperación no dependen relativamente del genotipo. Sin embargo, se observó que los genotipos con más genomas B sobreviven significativamente mejor que aquellos que sólo tienen el genoma A (Panis et al. 2005a). La observación bajo un microscopio de la recuperación de los meristemas crioconservados (Helliot et al. 2003) ha revelado que:

- (i) todo el domo del meristema aislado sobrevive a la exposición al nitrógeno líquido, y
- (ii) no se forman callos que no puedan ser regenerados después de la crioconservación. Por lo tanto, es poco probable que ocurra la variación somaclonal.

Las principales limitaciones de este procedimiento son las siguientes:

- Las tasas de viabilidad o regeneración después de la crioconservación varían de acuerdo al operador. Se requiere una experiencia considerable en la disección de los pequeños y frágiles meristemas apicales antes de poder aplicar este protocolo (utilizando este método sólo 60 meristemas pueden ser extirpados y crioconservados en un día).
- Muchos meristemas superviven pero se tornan negros y no son capaces de formar brotes regenerativos. Por lo tanto, es necesario optimizar las condiciones de regeneración.
- Las bajas tasas de crecimiento pueden ser debido a la baja calidad de los meristemas (puntas que están dañadas ligeramente o no se encuentran en la etapa correcta o están demasiado o poco cubiertas por los primordios foliares). Por lo tanto, se podría mejorar la calidad de las plantas donantes (más iluminación, menos plántulas en contenedores).
- Usando el método de vitrificación por microgotas, algunos investigadores han mostrado cierta preocupación con respecto a los efectos del contacto directo del nitrógeno líquido con el material vegetal. Sin embargo, los supuestos problemas como la contaminación y pérdida de material nunca aparecieron en el laboratorio del autor.

Este protocolo de vitrificación por microgotas fue aplicado con éxito recientemente a una gran variedad de especies de plantas como la papa, ulluco, patatas dulces, achicoria, fresa, taro, pelargonio, palma datilera, tomillo, olivo y lúpulo, y por lo tanto, podría ser considerado como el primer protocolo aplicable generalmente (Gallard et al. 2008, Sanchez-Romero y Panis 2008, Sant et al. 2008, Marco et al. 2007, Panta et al. 2006).

4.1.2 Crioconservación de agregados de meristemas

La parte más laboriosa de la crioconservación de este tipo de material es la preparación de los cultivos altamente proliferantes. La calidad de los agregados meristemáticos 'parecidos a la coliflor' puede ser muy pobre para utilizarlos en los experimentos de crioconservación (la calidad del tejido meristemático *versus* el tejido del cormo es muy baja y/o los explantes muestran demasiado ennegrecimiento). Esto puede deberse al hecho de que el cultivar pertenece a un grupo genómico 'difícil' (por ejemplo, bananos de altiplanos de África Oriental y muchos plátanos). Anteriormente, la proliferación se obtenía sólo utilizando el medio BA en concentraciones extremadamente altas, casi tóxicas (100 μM). Por lo tanto, el cultivo prolongado en 100 μM del medio que contiene BA a menudo resulta en la disminución de la calidad de los cultivos (la pérdida de las características típicas de 'parecidos a la coliflor'). Recientemente, el uso de las citoquininas alternativas como el tidiazurón (TDZ) a una concentración más baja (1 μM) demostró aumentar las tasas de proliferación (Strosse et al. *in press*).

4.1.3 Método sencillo de congelación

Un protocolo de congelación sencillo fue aplicado a 36 cultivares de banano pertenecientes a 8 grupos genómicos (Panis et al. 2002). Los resultados fueron extremadamente dependientes del genotipo. Los mejores resultados (hasta un 70% de nuevo crecimiento) han sido obtenidos con los cultivares ABB como Bluggoe, Cachaco y Monthan. Los resultados intermedios (alrededor de 25% de nuevo crecimiento) fueron alcanzados con los bananos de postre AAA y los bananos AAB. Los plátanos y diploides AAB respondieron mal generalmente. Para todos los cultivares bajo investigación pertenecientes a estos grupos genómicos, las plantas fueron regeneradas y cultivadas en el invernadero. Sin embargo, la mayoría de los bananos de altiplanos AAA no fueron capaces de aguantar una sencilla congelación.

Con respecto a este método de congelación sencilla, a menudo se observa el ennegrecimiento debido a la oxidación de los polifenoles cuando los meristemas descongelados se colocan en un medio semisólido. Esto puede provocar efectos citotóxicos y también puede dar como resultado que los agrupados recuperados estén rodeados por una capa impermeable, previniendo de este modo la absorción de nutrientes para el crecimiento. Uno de los métodos para vencer este problema consiste en utilizar un medio de regeneración líquido con el fin de diluir los polifenoles liberados.

Esto dio como resultado el aumento de los porcentajes de regeneración de más del 20%.

4.1.4 Vitrificación por microgotas de los agregados de meristemas 'parecidos a la coliflor'

Se descubrió que los porcentajes de un nuevo crecimiento después de descongelación de los meristemas precultivados en azúcar son más altos que los de los cultivados en un medio P4 normal. El precultivo en sacarosa parece aumentar la tolerancia de los meristemas no solo a la solución PVS2, sino también a los eventos dañinos que tienen lugar durante el proceso de congelación. Al comparar los resultados de la vitrificación por microgotas de los agregados de meristemas 'parecidos a la coliflor' con aquellos obtenidos utilizando el método sencillo de congelación para el mismo cultivar, se observó un aumento en los porcentajes de viabilidad para casi todos los cultivares. El aumento en la regeneración después de la descongelación para los bananos ABB es limitado. La recuperación sigue estando entre 50 y 70%. Para los bananos AAA de postre y bananos AAB, el aumento de los porcentajes de regeneración se remonta a 30-50%, mientras que para los plátanos se logró 20-30%. Los bananos de altiplanos AAA que demostraron ser recalcitrantes hacia la crioconservación utilizando la congelación sencilla, dieron una tasa de supervivencia de 0-20% mediante el método de vitrificación por microgotas.

Para la mayoría de las especies de plantas, la deshidratación óptima de los tejidos meristemáticos con el PVS2 se obtiene después de 10 a 30 minutos (Takagi 2000). Entre las excepciones se encuentran los brotes apicales de la patata dulce y de la piña, que deben ser tratados con el PVS2 por 100 minutos y 7 horas respectivamente (Plessis y Steponkus 1996, Gonzalez-Arno *et al.* 1998). La duración de este tratamiento debe ser optimizada caso por caso, ya que debe producirse una deshidratación suficiente para evitar la formación de los cristales de hielo letales durante la congelación. Al mismo tiempo es necesario tomar cuidados para prevenir el tratamiento con la solución potencialmente tóxica que daña irreversiblemente el tejido. En el caso de los cultivares de banano proliferantes precultivados en sacarosa, se observó que las tasas óptimas de regeneración después de la descongelación se obtienen generalmente después de 2 a 2.5 horas de tratamiento con el PVS2. Las tasas de supervivencia después de 3 horas para la mayoría de los cultivares son considerablemente más bajas, debido probablemente a la toxicidad de esta solución altamente concentrada.

4.1.5 Optimización de protocolos

Para facilitar el desarrollo de protocolos de crioconservación aún más eficaces, se requiere un mejor conocimiento de la base fisicoquímica de la crioconservación. Esto sólo puede ser aclarado a través de estudios fundamentales que involucran tanto el análisis termal como un examen

profundo de los distintos parámetros que influyen en el criocomportamiento, composición de las membranas, estrés oxidativo y proteínas protectoras. En el marco de un proyecto de investigación europeo (CRYMCEPT, ver <http://www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/tro/CRYMCEPT/>) y European Union COST Action (<http://www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/tro/cost871/Home.htm>) estos parámetros están siendo investigados para diferentes especies de plantas y entre ellas, el banano.

Hemos demostrado que una fase de precultivo en un medio con elevado contenido de concentración de sacarosa es esencial para que los cultivos de meristemas de banano se vuelvan tolerantes a la crioconservación. Existen numerosas prácticas aceptables de precultivo en sacarosa para el mejoramiento de la resistencia a la congelación. El precultivo en sacarosa resulta en una reducción lenta del contenido de humedad (Uragami 1991, Engelmann y Duval 1986, Zhu et al. 2006) debido a su efecto osmótico y de absorción de la sacarosa, bajando de este modo el punto de congelación y la cantidad de agua a congelar. Los azúcares también pueden mantener el estado cristalino líquido de las capas dobles de las membranas y estabilizan las proteínas bajo condiciones de congelación (Kendall et al. 1993). Un efecto indirecto de la sacarosa, que provoca un ligero estrés osmótico en el tejido, podría provenir de la acumulación de los compuestos que protegen contra el estrés hídrico, como la prolina (Delvallée et al. 1989). En el banano, hemos determinado que el precultivo en sacarosa induce cambios en proteínas (Carpentier et al. 2005, 2007), componentes de las membranas, azúcares y poliaminas (Zhu et al. 2006), incluso para cultivares que poseen distintas habilidades para la crioconservación. Estos análisis revelaron que el proceso crioprotector inducido por el precultivo en el azúcar es extremadamente complejo: además de los cambios en esteroides, ácidos grasos y poliaminas, y la producción de proteínas protectoras específicas, aún podrían existir parámetros o factores limitantes involucrados como la capacidad para la erradicación de radicales libres. Confiamos que cuando se determine el método exacto para el precultivo en sacarosa con respecto a la crioconservación, los distintos protocolos de crioconservación serán optimizados con una mayor eficacia.

A menudo, la ausencia de la reproducibilidad representa un factor que limita la aplicación habitual de crioconservación (Benson et al. 1996, Reed et al. 2001, 2004). Sin embargo, los investigadores de INIFAT (Instituto Nacional de Investigación Fundamental en Agricultura Tropical, Cuba) y FONAIAP (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela) (Surga et al. 1999), han aplicado exitosamente el método sencillo de congelación. En INIFAT, se obtuvo un porcentaje de supervivencia después de la descongelación de 34% para el cultivar local 'Burro criollo' (IPGRI 1996). Igualmente, el protocolo de vitrificación por microgotas fue aplicado con éxito al banano en NBPGR (*National Bureau for Plant Genetic Resources*), New Delhi, India (Agrawal et al. 2004).

4.1.6 Crioconservación de la colección de bananos

Actualmente, la vitrificación por microgotas de los meristemas apicales, igual que la vitrificación por microgotas de los agregados meristemáticos ‘parecidos a la coliflor’, están siendo aplicados en la colección de *Musa*. El método sencillo de congelación no se está aplicando más para estos propósitos en vista de los porcentajes relativamente bajos de regeneración después de la descongelación, obtenidos para la mayoría de los grupos genómicos. En la Tabla 2 se compara el trabajo requerido para los dos métodos que están actualmente aplicados.

Tabla 2. Comparación del trabajo requerido para realizar dos protocolos de crioconservación.

Método de congelación	Tempo de trabajo horas ¹	cvs/persona/año ²	Tiempo necesario mes ³	Cultivares
Vitrificación de los agregados proliferantes	30 a 40	59 a 44	12 a 13	ABB AAB algunos platanos AAB, ...
Vitrificación de los meristemas individuales	60 a 70	29 a 25	8 a 9	bananos AAAh <i>Musa acuminata</i> algunos platanos AAB, ...

¹ Tiempo calculado necesario para preparar el medio de cultivo y cultivos de meristemas seguido por la crioconservación. Para cada cultivar se realizan 3 repeticiones con al menos 6 criotubos para cada repetición que contienen de 10 (vitrificación de meristemas individuales) a 20 (vitrificación de agregados proliferantes) explantes. Para cada repetición se descongelan al menos tres muestras representativas (tubos) y se verifica la recuperación.

² 1 año = 220 días laborables (8 h/día).

³ Empezando con 2 tubos hasta que toda la accesión está almacenada de manera segura en nitrógeno líquido (3 repeticiones).

El método que requiere más trabajo (vitrificación de meristemas apicales extirpadas de las plantas enraizadas *in vitro*) solo se aplicará a los cultivares difíciles para crioconservar con otros métodos (por ejemplo, a los bananos de altiplanos AAA). Para las accesiones de banano, pertenecientes al grupo ABB y los bananos AAB (que no son plátanos), siempre se aplica la vitrificación por microgotas de agregados proliferantes, mientras que para *Musa acuminata* y los bananos de altiplanos de África Oriental el método preferido es la vitrificación por microgotas de meristemas apicales. Para todas las otras accesiones el método de elección se basa en (i) el grado de proliferación de los agregados meristemáticos que se obtienen después de tres ciclos de subcultivo en un medio que contiene altas concentraciones de citoquinina y (ii) la supervivencia de los agregados meristemáticos proliferantes después de un ensayo preliminar de crioconservación.

Para decidir si el experimento de criopreservación es exitoso o no, usamos el modo de cálculo desarrollado por Dussert y colaboradores (2003). Estos cálculos han sido aplicados a todos nuestros datos. Un experimento es considerado exitoso siempre que la posibilidad de regenerar al menos un brote del material almacenado sea más del 95%. Esta probabilidad depende de:

- (i) número de explantes almacenados a largo plazo en nitrógeno líquido (variando entre 30 y 50);
- (ii) número de explantes descongelados (variando entre 16 y 50); y
- (iii) porcentaje (%) de regeneración después de la descongelación.

Un experimento que conduce a un bajo nivel de probabilidad no será considerado exitoso, independientemente de su porcentaje de regeneración. En estos casos, se efectuará una nueva repetición.

Consideramos una accesión de banano conservada 'con seguridad' si se completan tres experimentos independientes (y exitosos). De acuerdo a estos requisitos actualmente estamos almacenando en nitrógeno líquido 655 accesiones pertenecientes a 30 diferentes grupos genómicos de banano (situación a finales de 2008).

4.2 SUSPENSIONES DE CÉLULAS

4.2.1 Pretratamientos

A menudo en los protocolos de criopreservación se incluye una fase de crecimiento previo para aumentar la tolerancia de los cultivos de tejidos a la congelación. Compuestos activos osmóticamente como sorbitol o manitol se añaden para reducir el agua celular antes de la congelación, reduciendo así la cantidad de agua disponible para la formación de hielo letal (Withers y Street 1977). En el caso de las células de banano, se descubrió que la deshidratación osmótica con manitol al 6% (w/v) por 2 o 7 días no afecta la viabilidad después de la criopreservación (resultados no publicados). Sin embargo, para una suspensión de células derivadas de brotes masculinos de *Musa acuminata*, el precultivo con 180 g/L de sacarosa durante 24 horas mostró ser beneficioso (Côte et al. 2000).

4.2.2 Crioprotección

Se examinaron diferentes soluciones crioprotectoras, que consistían del medio MS con 30 g/L de sacarosa incluyendo el DMSO (a 2.5, 5, 7.5, 10 y 15% (v/v)), glicerol (a 5, 10 y 15% (v/v)), prolina (a 10% (v/v)), y una mezcla crioprotectora (que contiene 0.5 M de Glicerol, 0.5 M de DMSO y 1 M (=342 g/L) de sacarosa). Aunque todos los tratamientos dieron como resultado, de acuerdo a la prueba de viabilidad de FDA, la supervivencia de las células congeladas, sólo el DMSO a 5, 7.5 y 10% (v/v) dio un crecimiento satisfactorio después de la descongelación. La adición de niveles de sacarosa

más altos (180 g/L) a la solución crioprotectora tuvo, para la mayoría de las suspensiones, un efecto positivo sobre el porcentaje de viabilidad de FDA y, lo que es más importante, sobre el crecimiento después de la descongelación. Este hecho también se observó en los callos embriogénicos de la caña de azúcar (Martinez-Montero et al. 1998).

4.2.3 Congelación

Un crecimiento comparable después de la descongelación se obtiene utilizando el baño de metanol y Contenedor de Congelación Nalgene™ cryo 1°C, con tal de que los criotubos se transfieran al nitrógeno líquido tan pronto se obtenga la temperatura de -40°C. Si el Contenedor de Congelación Nalgene™ cryo 1°C se deja durante la noche en un congelador con temperatura de -80°C, no se observa recuperación después de la descongelación. El uso del Contenedor de Congelación Nalgene™ cryo 1°C también mostró ser muy eficaz para las suspensiones de células embriogénicas iniciadas a partir de flores masculinas (Côte et al. 2000). Su principal ventaja consiste en que no se necesita un equipo costoso (exceptuando el congelador para alcanzar -80°C) para controlar el congelamiento lento.

4.2.4 Tratamientos después de la congelación

La remoción de la solución crioprotectora 'potencialmente tóxica' inmediatamente después de la descongelación y su reemplazo por un medio líquido sin crioprotectores, antes de transferir los cultivos a un medio semisólido, da como resultado una pérdida completa de la capacidad de nuevo crecimiento y las células se tornan blancas. La transferencia directa de las células a un medio líquido que somete las células a estrés similar al de lavado después de descongelación, igualmente resulta en fallo de crecimiento. El nuevo crecimiento sólo puede ser logrado cuando las células, aún suspendidas en la solución crioprotectora, se transfieren directamente a un medio semisólido.

Utilizando el protocolo optimizado para crioconservación descrito anteriormente, KULeuven actualmente está almacenando en nitrógeno líquido más de 2700 criotubos que contienen suspensiones de células embriogénicas pertenecientes a 19 cultivares de banano diferentes. Recientemente, se recuperaron suspensiones celulares de banano después de 15 años de almacenamiento. La habilidad de producir embriones somáticos permaneció intacta y se podría establecer nuevas suspensiones de células embriogénicas a partir del material congelado.

El hecho de que algunas suspensiones celulares de banano no son capaces de resistir la crioconservación podría ser considerado como una razón para la futura optimización del protocolo de crioconservación. En adición al procedimiento más convencional, que involucra congelación lenta en presencia de una solución crioprotectora que a menudo contiene el

DMSO, también se informó sobre la obtención de una crioconservación exitosa después de la vitrificación (Watanabe et al. 1995, Huang et al. 1995, Nishizawa et al. 1993, Sakai et al. 1990), encapsulación-deshidratación (Bachiri et al. 1995, Swan et al. 1998), encapsulación-vitrificación (Gazeau et al. 1998), encapsulación combinada con la congelación lenta (Gazeau et al. 1998) y vitrificación combinada con la congelación lenta (Wu et al. 1997). Sin embargo, ya que las suspensiones de células, que son recalcitrantes al protocolo de crioconservación descrito anteriormente, no se regeneran, ellas no se usarán en la ingeniería genética. Por lo tanto, su conservación podría ser de valor más bien científico que práctico.

Apéndices

Apéndice 1. Composición de medios y soluciones

Medio MS (Murashige y Skoog 1962)

Componentes MS	Concentración (mg/L)
Sales inorgánicas	
Cloruro de calcio	332.02
Nitrato de amoníaco (NH_4NO_3)	1650
Sulfato de magnesio	80.70
Acido bórico (H_3BO_3)	6.2
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.90
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Nitrato de potasio (KNO_3)	1900
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	170
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.60

Fuente de hierro

Sodio EDTA ($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$)	37.26
Sulfato ferrico ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.80

Vitaminas

Mio-inositol	100
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina HCL	0.5
Tiamina HCl	0.5
Glicina (forme libre)	2.00

Vitaminas de Morel (Morel 1950)

Pantotenato de calcio	1
Mio-inositol	100
Acido nicotínico	1
Piridoxina HCL	1
Tiamina HCl	1
Biotina	0.01

Medio P5

Medio MS complementado con sacarosa de 30g/L, 10 μ M de BA, 1 μ M de IAA, 2 g/L de gelrita o 5 g/L de agar (Banerjee y De Langhe 1985). (pH:5.8).

Medio P4

Medio P5 con una concentración de BAP 10 veces más alta (100 μ M).

Medio de precultivo (PCM)

Este medio contiene todos los elementos del P5 pero los niveles de sacarosa están aumentados hasta una concentración final de 0.4 M (=136.8 g/L).

Medio de regeneración P6

Medio P5 con una concentración de BAP 10 veces más baja (1 μ M).

Solución de pretratamiento

Componentes del medio MS diluidos en agua complementada con 2 M de glicerol y 0.4 M (=136.8 g/L) de sacarosa; el pH es ajustado a 5.8. La solución es esterilizada a través de un filtro (0.22 μ m).

Solución PVS2

Consiste de glicerol a 30% (w/v) (3.26 M), etileno glicol a 15% (w/v) (2.42 M) (EG), DMSO a 15% (w/v) (1.9 M) y 0.4 M (= 136.8 g/L) de sacarosa (Sakai et al. 1990). Todos estos componentes se disuelven en el medio MS, el pH es ajustado a 5.8 seguido por una esterilización con filtro (0.22 μ m).

Solución postratamiento

El filtro es esterilizado (0.22 μ m), la solución postratamiento consiste de 1.2 M (410.4 g/L) de sacarosa disuelta en el medio MS. (pH:5.8).

Medio ZZ

Macro elementos y hierro de MS a mitad de su poder, microelementos de MS, 5 μ M 2,4-D, 1 μ M de zeatina, vitaminas estándar de MS, 10 mg/L de ácido ascórbico, y 30 g/L de sacarosa. (pH:5.8).

Medio RD1

Macroelementos y hierro de MS, microelementos de MS, 1 μ m de BA, vitaminas estándar de MS, 100 mg/L de mio-inositol, 10 mg/L de ácido ascórbico, 30 g/L de sacarosa y 2 g/L de gelrita (pH 5.8).

Medio MA2

Macro y microelementos de MS, biotina 1 mg/L, glutamina 100 mg/L, extracto de malta 100 mg/L, 2,4-D 1 mg/L y sacarosa 45 g/L (pH 5.3).

Medio MA3

Sales inorgánicas	Concentración (mg/L)
KNO ₃	2500
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
MnSO ₄ · H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1
KI	1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.1
CoCl ₂	0.1

Fuente de hierro

FeSO ₄ · 7H ₂ O	15
Na ₂ DTA	20

Vitaminas MS**Otros componentes**

ANA	0.2
Zeatina	0.05
2iP	0.2
Kinetina	0.1
Lactosa	10 g/L
Sacarosa	45 g/L
Agarosa	7 g/L

pH 5.3

Apéndice 2. Equipo básico requerido

Herramientas (fórceps y escalpelos)

Fuente de nitrógeno líquido (LN)

Criotanques - 1 para el almacenamiento del nitrógeno líquido

- 1 para almacenar el material vegetal con enrejado o cajas
(2 para seguridad)

Cajas de poliestireno

Recipientes de Dewar

Criotubos esterilizados de 2 ml y portador de criotubos (12 x 12)

Baño de metanol de agitación (-40°C) *o* contenedor de propanol, baño de alcohol (por ejemplo, Contenedor de Congelación Nalgene™ cryo 1°C) *o* Congelador programable (sólo para los propósitos de investigación o aplicaciones a gran escala) *o* (congelador para -70°C o -80°C + Mr. Freeze)

Químicos (DMSO, PEG, etc.)

Microscopio estereoscópico binocular (con una buena fuente de luz)

Microscopio de fluorescencia (opcional)

Equipo de seguridad: guantes y lentes (para manipular nitrógeno líquido)

Baño María (o agua tibia en un recipiente plástico)

Termómetro

Temporizador

Hielo picado y bloques de hielo

Apéndice 3. Lista de abreviaturas

2,4 D	2,4-ácido diclorofenoxiacético
BA, BAP	6-benzilaminopurina
DMSO	sulfóxido de dimetilo
EG	glicol de etileno
FDA	diacetato fluorescein
IAA	ácido indoleacético
LN	nitrógeno líquido
Medio MS	medio Murashige y Skoog
PEG	glicol de polietileno
TTC	Cloruro de trifenilo tetrazolio

Bibliografía

- Abdelnour-Esquivel A., A. Mora & V. Villalobos. 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *Musa balbisiana* (BB). *CryoLetters* 13:159-164.
- Agrawal A., R. Swennen & B. Panis. 2004. A comparison of four methods for cryopreservation of meristems in banana (*Musa* spp.). *CryoLetters* 25:101-110.
- Bachiri Y., C. Gazeau, J. Hansz, C. Morisset & J. Dereuddre. 1995. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 43:241-248.
- Banerjee N. & E. De Langhe. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Rep.* 4:351-154.
- Benson E.E., M. Wilkinson, A. Todd, U. Ekuere & J. Lyon. 1996. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips. *CryoLetters* 17:119-128.
- Carpentier S., E. Witters, K. Laukens, H. Van Onckelen, R. Swennen & B. Panis. 2007. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. *Proteomics* 7:92-105.
- Carpentier S., E. Witters, K. Laukens, P. Deckers, R. Swennen & B. Panis. 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5:2497-2507.
- Côte F.X., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson & J.V. Escalant. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. 'Grand nain'. *Physiol. Plant.* 97:285-290.
- Côte F.X., O. Goue, R. Domergue, B. Panis & C. Jenny. 2000. In-field behavior of banana plants (*Musa* spp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *CryoLetters* 21:19-24.
- Delvallée I., J. Guillaud, M. Beckert & C. Dumas. 1989. Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and in vitro. *Plant Sci.* 60:129-136.
- Dhed'a D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke & E. De Langhe. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp., ABB group). *Fruits* 46(2):125-135.
- Dixon R.A. 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. Pp. 1-20 in *Plant cell culture. A practical approach* (R.A. Dixon, ed.). IRL Press, Oxford.
- Dussert S., F. Engelmann & M. Noirot. 2003. Development of probalistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* 24:149-160.
- Engelmann F. & Y. Duval. 1986. Cryopreservation of oil palm somatic embryos (*Elaeis guineensis* Jacq.): results and application prospects. *Oléagineux* 41:169-174.
- Engelmann F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genet. Res. Newsl.* 112:9-18.
- Escalant J.V. & C. Teisson. 1987. Comportement in vitro de l'embryon isolé du bananier. *Fruits* 42(6):333-342.
- Gallard A., B. Panis, N. Dorion, R. Swennen & A. Grapin. 2008. Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification. *CryoLetters* 29: 243-251.
- Gazeau C., H. Elleuch, A. David & C. Morisset. 1998. Cryopreservation of transformed *Papaver somniferum* cells. *CryoLetters* 19(3):147-159.
- González-Arno M.T., M. Márquez, C. Urrea, M. Martínez-Montero & F. Engelmann. 1998. Cryopreservation of apices from pineapple (*Ananas comosus*) in vitro plantlets. *CryoLetters* 19:375-382.
- Hamill S., K. Wasmund, M. Smith, K. Eccleston & D. McKay. 2005. Endogenous bacterial isolated from banana meristems during tissue culture initiation: problems and potential. pp.101-111 in *Contributing to a Sustainable Future*. (Benett, I.J., Bunn, E., Clarke, H., and McComb, J.A., eds). Proc. Australian Branch IAPTC & B. Perth, Western Australia, AU.
- Helliot B., R. Swennen, Y. PouMay, E. Frison, P. Lepoivre & B. Panis. 2003. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Rep.* 21:690-698.

- Hernandez J.B., S. Remy, V. Galán Saúco, R. Swennen & L. Sági. 1998. Chemotactic movement and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to single cells and tissues of banana. *J. Plant Physiol.* 155:245-250.
- Huang C.-N., J.-H. Wang, Q.-S. Yan, X.-Q. Zhang & Q.-F. Yan. 1995. Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic cell suspension cells cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep.* 14:730-734.
- IPGRI. 1996. Final report of the project 'Refinement of cryopreservation techniques for the long-term conservation of sugarcane and banana in Cuba'. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Kendall E.J., K.K. Kartha, J.A. Qureshi & P. Chermak. 1993. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using abscisic acid pretreatment. *Plant Cell Rep.* 12:89-94.
- Marco A., J.L. Casas & B. Panis. 2007. Crioconservación de *Thymus moroderi*. VII Reunion de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales. Alcalá de Henares, Madrid, Spain, 25-27 June 2007.
- Martínez-Montero M., M.T. González-Arno, C. Borroto-Nordelo, C. Puentes-Díaz & F. Engelmann. 1998. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process. *CryoLetters* 19: 171-176.
- Matsumoto T., A. Sakai & K. Yamada. 1994. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 13:442-446.
- Morel G. 1950. Sur la culture des tissus de deux monocotylédones. *C.R. Acad. Sc. Paris* 230:1099-1101.
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nishizawa S., A. Sakai, Y. Amnao & T. Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci.* 91:67-73.
- Panis B. 1995. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. *Dissertationes de Agricultura* 272. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. 201pp.
- Panis B., I. Van den houwe, B. Piette & R. Swennen. 2007. Cryopreservation of the banana germplasm collection at the International Transit Centre - Bioversity International. *Adv. Hort. Sci.* 21: 235-238.
- Panis B., B. Piette & R. Swennen. 2005a. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci.* 168:45-55.
- Panis B., B. Helliot, H. Strosse, S. Remy, P. Lepoivre & R. Swennen. 2005b. Germplasm conservation, virus eradication and safe storage of transformation competent cultures in banana: The importance of cryopreservation. *Acta Hort.* 692:51-59.
- Panis B., H. Strosse, S. Van den Hende & R. Swennen. 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *CryoLetters* 23:375-384.
- Panis B., H. Schoofs, S. Remy, L. Sági & R. Swennen. 2000a. Cryopreservation of banana embryogenic suspensions: an aid for genetic transformation. Pp.103-109 in *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application* (F. Engelmann & H. Takagi, eds). Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Panis B., H. Schoofs, N.T. Thinh & R. Swennen. 2000b. Cryopreservation of proliferating meristem cultures of banana. Pp. 238-243 in *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application* (F. Engelmann & H. Takagi, eds). Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Panis B., K. Vandenbranden, H. Schoofs & R. Swennen. 1998. Conservation of banana germplasm through cryopreservation. Pp. 515-521 in *Proceedings of the International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species, Brisbane, Queensland, Australia, 29 Sept.-3 Oct. 1997* (R.A. Drew, ed.). *Acta Hort.* 461. ISHS.
- Panis B., N. Totté, K. Van Nimmen, L.A. Withers & R. Swennen. 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Sci.* 121:95-106.
- Panis B., A. Van Wauwe & R. Swennen. 1993. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp). *Plant Cell Rep.* 12:403-407.

- Panis B., L.A. Withers & E. De Langhe. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *CryoLetters* 11:337-350.
- Panta A., B. Panis, C. Ynouye, B. Criel, R. Swennen & W. Roca. 2006. Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of Andean landraces at CIP. 43rd Meeting of the Society for Cryobiology in association with the Society for Low Temperature Biology. Hamburg, Germany, 24-27 July 2006.
- Plessis P. & P.L. Steponkus. 1996. Cryopreservation of sweet potato shoot-tips by vitrification. *Cryobiology* 33:655-656.
- Reed B.M., D. Dumet, J.M. Denoma & E.E. Benson. 2001. Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes L.*, *Biodivers. Conserv.* 10:939-949.
- Reed B.M., I. Kovalchuk, S. Kushnarenko, A. Meier-Dinkel, K. Schoenweiss, S. Pluta, K. Straczynska & E.E. Benson. 2004. Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. *CryoLetters* 25:341-352.
- Reed B.M. 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. New York, NY: Springer. 515 p
- Remy S., E. Thiry, B. Coemans, S. Windelinckx, R. Swennen and L. Sági. 2005. Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. *BioTechniques* 38:763-770.
- Sági L., B. Panis, S. Remy, H. Schoofs, K. De Smet, R. Swennen & B.P.A. Cammue. 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Bio/Technol* 13:481-485.
- Sági L., S. Remy, B. Panis, R. Swennen & G. Volckaert. 1994. Transient gene expression in electroporated banana protoplasts (*Musa* spp. cv. 'Bluggoe', ABB group) isolated from embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Rep.* 13:262-266.
- Sakai A. & F. Engelmann. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. *CryoLetters* 28:151-172.
- Sakai A., S. Kobayashi & I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9:30-33.
- Sánchez-Romero C. & B. Panis. 2008. Cryopreservation of olive embryogenic cultures. Cryopreservation of crop species in Europe. CRYOPLANET - COST Action 871. Agrifood Research Working papers 153. Oulu, Finland, 20-23 February 2008. 24-25.
- Sant R., B. Panis, M. Taylor & A. Tyagi. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92:107-111.
- Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. *Dissertationes de Agricultura* 330. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. 257pp.
- Strosse H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant & F. Côte. 2003. Banana and Plantain embryogenic cell suspensions (A. Vézina and C. Picq, eds). INIBAP Technical Guidelines 8. INIBAP, Montpellier, France. 31 pp.
- Strosse H., H. Schoofs, B. Panis, E. André, K. Reyniers & R. Swennen. 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Sci.* 170: 104-112.
- Strosse H., E. André, L. Sági, R. Swennen & B. Panis. (*in press*). Adventitious shoot formation is not inherent to micropropagation of banana as it is in maize. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Surga J., R. Swennen & B. Panis. 1999. Crioconservación de meristemas en el banano (*Musa* spp.): optimización de la regeneración. *InfoMusa* 8(1):23-24.
- Swan T.W., E.A. Deakin, G. Hunjan, G.R. Souch, M.E. Spencer, A.M. Stafford & P.T. Lynch. 1998. Cryopreservation of cell suspensions of *Polygonum aviculare* using traditional controlled rate freezing and encapsulation/dehydration protocols, a comparison of post-thaw cell recovery. *CryoLetters* 19:237-248.
- Takagi H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. Pp. 178-193 in *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application* (F. Engelmann & H. Takagi, eds). Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
-

- Takagi H., N.T. Thinh, O.M. Islam, T. Senboku & A. Sakai. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep.* 16:594-599.
- Thinh N.T., H. Takagi & S. Yashima. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method. *CryoLetters* 20(3):163-174.
- Thomas P., G.K. Swarna, P.K. Roy & P. Patil. 2008. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv Grand Naine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 93: 55-63.
- Uragami A. 1991. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis*) cultured *in vitro*. *Res. Bul. Hokkaido Natl. Agr. Exp. Stn.* 156:1-37.
- Van den Houwe I. & R. Swennen. 2000. Characterization and control of bacterial contaminants in *in vitro* cultivars of banana (*Musa* spp.). *Acta Hort.* 530:69-79.
- Watanabe K. & P.L. Steponkus. 1995. Vitrification of *Oryza sativa* L. cell suspensions. *CryoLetters* 16:255-262.
- Widholm J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47:189-194.
- Withers L.A. & H.E. Street. 1977. Freeze-preservation of cultured plant cells III: The pre-growth phase. *Physiol. Plant* 39:171-178.
- Wu Y., F. Engelmann, A. Frattarelli, C. Damiano & L.A. Withers. 1997. Cryopreservation of strawberry cell suspensions. *CryoLetters* 18:317-324.
- Zhu G. Y., J. Geuns, S. Dussert, R. Swennen & B. Panis. 2006. Sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristem cultures in relation to cryopreservation ability. *Physiol. Plant.* 128:80-94.

LITERATURA ADICIONAL RECOMENDADA

- Argent G.C.G. 1976. The wild bananas of Papua New Guinea. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinb.* 35:77-114.
- Bajaj Y.P.S. 1995. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 32: Cryopreservation of Plant Germplasm 1.* Springer, Berlin.
- CGIAR. 1992. Review of CGIAR priorities and strategies, Part 1, section 5.3.5. Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR), Washington DC, USA.
- Chin H.F. 1996. Germination and storage of banana seeds. Pp. 218-227 *in* Proceedings of the workshop on New Frontiers in Resistance Breeding for Nematodes, *Fusarium* and Sigatoka, 2-5 October 1995, Kuala Lumpur, Malaysia (E.A. Frison, J.P. Horry & D. De Waele, eds). INIBAP, Montpellier, France.
- Dereuddre J., C. Scottez, Y. Arnaud & M. Duro. 1990. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effects of previous cold hardening. *C.R. Acad. Sci. Paris, T. 310, Série III:*317-323.
- Dumet D., F. Engelmann, N. Chabrilange & Y. Duval. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Rep.* 12: 352-355.
- Engelmann F. & H. Takagi (eds). 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- FAO. 1997. *Production Year Book 1997.* Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome.
- Fuller B.J., N. Lane & E.E. Benson. 2004. *Life in the Frozen State.* CRC Press, Boca Raton.
- Hahn S., D. Vuylsteke & R. Swennen. 1990. First reactions to ABB cooking bananas distributed in southeastern Nigeria. Pp. 306-315 *in* Sigatoka leaf spot diseases of banana (R.A Fullerton & R.H. Stover, eds). INIBAP, Montpellier, France.
- Humphrey J.E. 1896. The development of the seed in Scitamineae. *Ann. Bot. Lond. O.S.* 10:1-40.
- INIBAP. 1988. *Annual Report 1987.* International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France. 43pp.

- INIBAP. 1998. Annual Report 1997. International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France. 72pp.
- Jamaluddin S.H. 1986. Characterization, evaluation and utilization of the banana germplasm in Malaysia. Pp. 315-329 in *Prosid. Simp. Buahbuahan Keb.* (Y.K Chan & P. Raveendranathan, eds). MARDI, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Kiew R. 1987. Notes on the natural history of the Johore Banana, *Musa gracilis* Holtum. *Malayan Nature Journal* 41:239-248.
- Persley G.J. & E.A. De Langhe (eds). 1987. Banana and plantain breeding strategies: Proceedings of an international workshop held at Cairns, Australia, 13-17 October, 1986. ACIAR proceedings No. 21. 187pp.
- Sagi L., G.D. May, S. Remy & R. Swennen. 1998. Recent developments in biotechnological research on bananas (*Musa* spp.). *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15:313-327.
- Sakai A. 1997. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. Pp. 53-66 in *Conservation of plant genetic resources in vitro* (M.K. Razdan & E.C. Cocking, eds). Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA.
- Simmonds N.W. 1952. The germination of banana seeds. *Trop. Agriculture, Trin.* 29:2-16.
- Simmonds N.W. 1955. Wild bananas in Malaya. *Malayan Nature Journal*, 10:1-8.
- Swennen R. & D. Vuylsteke. 1993. Breeding black Sigatoka resistant plantains with a wild banana. *Trop. Agric.* 70(1):74-77.
- Towill L.E. & Y.P.S. Bajaj. 2001. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 32: Cryopreservation of Plant Germplasm 2.* Springer, Berlin.
- Tribe D.E. 1994. Feeding and greening the world. The role of international agricultural research. CABI, Oxon, UK. 274pp.
- Uragami A., A. Sakai & M. Nagai. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 9:328-331.
- Van den Houwe I., K. De Smet, H. Tezenas du Montcel & R. Swennen. 1995. Variability in storage potential of banana shoot cultures under medium-term storage conditions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 42:269-274.
- Vuylsteke D., R. Ortiz, R.S. Ferris & J.H. Crouch. 1997. Plantain improvement. Pp. 267-320 in *Plant Breeding Reviews*. Vol. 14 (J. Janick, ed.). John Wiley, New-York, USA.
- Wesley-Smith J., C.W. Vertucci, P. Berjak, N.W. Pammenter & J Crane. 1992. Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. *J. Plant Physiol.* 140:596-604.
- Withers L.A. 1992. *In vitro* conservation. Pp. 169-200 in *Biotechnology of perennial fruit crops* (F.A. Hammerschlag & R.E. Litz, eds). *Biotechnology in agriculture* No. 8. CAB International, Wallingford, UK.
-



Bioversity International,
Bioversity en forma
abreviada, es el nombre
con el que operan el Instituto
Internacional de Recursos
Fitogenéticos (IPGRI) y la
Red Internacional para el
Mejoramiento del Banano
y el Plátano (INIBAP).

Auspiciado por el GCIAI

ISBN: 978-2-910810-88-7